



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
Departamento de Genética Molecular**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Caracterización del Sistema de Dos Componentes BarA/UvrY en
*Escherichia coli***

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA**

Verónica Alejandra Mondragón Jaimes

Director de Tesis

Dr. Dimitris Georgellis

Ciudad Universitaria, Junio del 2007.



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.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 226 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Dimitris Georgellis y la asesoría de los doctores Gloria Soberón Chávez y Roberto Coria Ortega. Durante la realización del mismo, Verónica Alejandra Mondragón Jaimes fue becaria de la PROMEP.

La presente investigación contó con el apoyo económico de CONACyT (proyectos 37341N y 47799) y PAPIIT (proyectos IN-218902, IN221106).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el invaluable apoyo recibido durante la realización de la tesis, de mis tutores:

Dr. Dimitris Georgellis

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Roberto Coria Ortega.

Agradezco el apoyo de la técnico del Laboratorio 226 Nte: M. en C. Claudia Rodríguez Rangel.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nayarit su apoyo en este logro

Un Agradecimiento Especial

A mi Tutor:

Gracias Dimitris por creer en tus estudiantes. Gracias por creer que a pesar de mis agraviantes podía terminar este trabajo. Has sido un gran tutor y apoyo en los momentos difíciles, valoro toda la ayuda y confianza que depositaste en mi. Has dejado huella en mi formación.

DEDICATORIAS

- Con todo mi amor a mis hijos Leonardo, Daniela y Pablo.
- Gracias Dany por apoyarme con Pablo, cuando mamá trabajaba.
- Gracias Leo por ese mundo nuevo que me enseñas cada día.
- Con amor y profundo agradecimiento por su apoyo, su espíritu emprendedor y cariño a Toño, el compañero de mi vida.
- A papá y mamá, porque siempre están conmigo.
- A mis cuatro hermanas Rosi, Gaby Nora y Soco (†).
- A mis niños Sergio, Aranza y Nathy.
- Gracias Gaby, Fabiola, Javo, Luis y Yael por su bonita amistad.
- Con especial agradecimiento y profundo cariño a mi pequeño Bernardo, mi maestro y amigo.
- A mis compañeros de Laboratorio: Roxana, Claudita, Claudia, Luis, Carlos, Ricardo y la bella Maria.
- Gracias Ivonne, gracias Don Pedro, por su invaluable trabajo, apoyo y compañía.
- A mis amigos, que afortunadamente son muchos, en cualquier lugar del mundo donde se encuentren.

ÍNDICES

Índice general

	<i>Página</i>
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
Capítulo 1.- INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 2.- EL SISTEMA BarA/UvrY	5
2.1 Descripción de BarA	5
2.1.1 Dominios funcionales de BarA	5
2.1.2 Funciones de BarA	7
Respuesta ante el estrés ambiental	7
Papel de BarA en la formación de biopelículas	8
Papel de BarA en la patogenicidad	9
2.2 Descripción de UvrY	11
2.2.1 Genes regulados por BarA/UvrY	13
Los genes <i>csrB csrC</i>	15
El gen <i>rpoS</i>	17
2.2.2 Función de UvrY en <i>Escherichia coli</i>	19
Capítulo 3.- EL PAPEL DEL ACETIL-FOSFATO EN LOS SDC	20
Capítulo 4.- QUORUM SENSING	21
Capítulo 5.- JUSTIFICACIÓN	23
Capítulo 6.- MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Medios y condiciones de crecimiento	24
6.2 Efecto de la microaerofilia sobre la actividad transcripcional de <i>csrB</i> .	24
6.3 Efecto de la densidad poblacional sobre la actividad transcripcional de <i>csrB</i> .	25
6.4 Efecto del pH sobre la actividad transcripcional de <i>csrB</i> .	25
6.5 Efecto de la glucosa sobre la actividad transcripcional de <i>csrB</i>	26
6.6 Construcción de plásmidos y cepas	26
6.7 Determinación de la actividad de β -galactosidasa	27

6.8 Preparación de suero anti-UvrY e inmunodetección	28
Capítulo 7.-RESULTADOS	29
7.1 Identificación de las condiciones ambientales que activan la CS BarA.	29
7.2 Activación dependiente de la densidad poblacional	29
7.3 Activación en anaerobiosis	30
7.4 Activación en diferentes medios de cultivo	31
7.5 Activación en diferentes pH`s	31
7.6 Efecto del pH sobre ArcA/ArcB	36
7.7 Efecto del pH sobre la presencia de BarA/UvrY	37
7.8 Efecto de la glucosa sobre la actividad	38
Capítulo 8.- DISCUSIÓN	41
Capítulo 9.- CONCLUSIONES	47
Capítulo 10.- PERSPECTIVAS.	48
REFERENCIAS	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Identidad entre las proteínas ortólogas de UvrY de diferentes especies de γ proteobacterias.	13
Tabla 2. Diferentes especies dentro del grupo de las γ proteobacterias poseen SDC ortólogos de BarA/UvrY.	19
Tabla 3. Plásmidos y cepas	27
Tabla 4. Cambio de pH en cultivos con glucosa	39

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la CS tripartita BarA de <i>E. coli</i>	2
Figura 2. Fosforrelvo en el sistema BarA/UvrY en <i>Escherichia coli</i> .	3
Figura 3. Estructura de UvrY.	12
Figura 4. Genes regulados por el sistema BarA/UvrY.	14
Figura 5. Efecto de la densidad óptica inicial sobre la activación de BarA/UvrY y expresión de <i>csrB-lacZ</i> .	30
Figura 6. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la activación de BarA/UvrY y expresión de <i>csrB</i> .	32

Figura. 7. Efecto del pH sobre la activación del sistema BarA/UvrY y expresión de la fusión <i>csrB-lacZ</i> .	33
Figura. 8. Efecto del pH externo sobre la activación del sistema BarA/UvrY y expresión de <i>csrB-lacZ</i> .	35
Figura 9. Efecto del pH sobre la expresión de las fusiones <i>lldp-lacZ</i> y <i>cyd-lacZ</i> .	36
Figura 10.- Efecto del pH sobre la expresión de las fusiones transcripcionales <i>barA-lacZ</i> y <i>uvrY-lacZ</i> .	37
Figura 11.- Efecto del pH sobre la expresión de la fusión transduccional <i>uvrY-lacZ</i> .	38
Figura. 12 Determinación de BarA y UvrY por Western blot.	39
Figura 13. Efecto de la glucosa en condiciones de acidez, sobre la activación del sistema y expresión de la fusión <i>csrB-lacZ</i> .	40

ABREVIATURAS

SDC	Sistema de dos componentes
CS	Cinasa sensora
RR	Regulador de respuesta
QS	Quorum sensing
HAMP	<u>H</u> istidine kinase <u>A</u> denyl cyclase, <u>M</u> ethyl binding proteins, <u>P</u> hosphatases
sRNA	RNA pequeño
Pta	Fosfotransacetilasa
AckA	Acetato cinasa
Amp	Ampicilina
Cm	Cloramfenicol
Kan	Kanamicina
LB	Luria Bertani
ONPG	Orto-fenilen-pirogalactósido

RESUMEN

La cinasa sensora BarA y su regulador de respuesta UvrY son miembros de un sistema de dos componentes que se encuentra distribuido en una amplia variedad de bacterias Gram negativas. Este sistema ha sido estudiado principalmente en especies de los género *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Escherichia* y *Erwinia*. El sistema BarA/UvrY y sus ortólogos controlan la producción de metabolitos secundarios, enzimas extracelulares, toxinas, y mecanismos de invasividad en las especies patógenas tanto en plantas como en animales, además de regular el sistema de almacenamiento de carbono Csr. No se ha descrito la señal de activación ni las condiciones ambientales necesarias en ninguna de las especies mencionadas. Se propone que BarA detecta la señal desconocida y activa por medio de un mecanismo de fosforrelevo al regulador transcripcional UvrY, el cual a su vez modulará la expresión de una serie de genes bajo su control, entre ellos *csrB* y *csrC*. Ambos genes controlan los niveles de la proteína CsrA, la que a su vez regula el metabolismo del carbono y sus productos.

En este estudio se exploraron 3 condiciones ambientales que pueden influir en la activación del sistema BarA/UvrY. Se probó el efecto del oxígeno, la densidad óptica inicial y el pH externo. La activación del sistema, se midió por la expresión de fusiones con *lac-Z* de los genes regulados por BarA/UvrY; *csrB/ csrC*. La expresión de las fusiones por ensayos de β -galactosidasa indicó que la activación del sistema no depende de la presencia de oxígeno ni de la concentración bacteriana inicial. La dependencia de la activación, se midió en pH 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0. Se demostró que la activación de BarA/UvrY responde a las condiciones de pH, ya que en pH 5.0, no se observó expresión de los reporteros. pH's mayores permitieron las condiciones adecuadas de activación. El incremento paulatino del pH mostró un umbral de activación a pH 5.5. En ausencia de activación, se observó la expresión de los reporteros al adicionar glucosa. La activación bajo estas condiciones, no fue inmediata, lo que sugiere el metabolismo inicial de la glucosa y un posible papel de sus metabolitos en la activación del sistema BarA/UvrY.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los organismos unicelulares suelen experimentar cambios drásticos en su ambiente, tales como cambios en la temperatura, el pH, la osmolaridad, los nutrientes, entre otros. La capacidad para responder a esta gama de presiones ambientales determina la adaptación y sobrevivencia de los microorganismos. La detección de diversos estímulos se lleva a cabo a través de circuitos moleculares que perciben los cambios ambientales y los procesan en una respuesta específica. En organismos procariontes, al igual que en algunos eucariontes como en hongos y levaduras (Stock *et al.*, 2000), estos circuitos moleculares se componen de dos elementos: una cinasa sensora (CS) y un regulador de respuesta (RR). A esta vía de señalización se le ha denominado genéricamente como “Sistema de dos Componentes” (SDC). En bacterias los SDC regulan eventos tales como el metabolismo, la esporulación, la virulencia, la fijación del N₂, la quimiotaxis, y las interacciones entre patógenos y su célula hospedera tanto en animales como en vegetales (Barret and Hoch., 1998; Hoch JA., 2000).

Generalmente las CS son proteínas con un segmento amino terminal citosólico corto, dos segmentos transmembranales que delimitan un dominio periplásmico, y un dominio citosólico catalítico. La recepción de la señal se cree que ocurre en el dominio periplásmico de la CS, pero se tienen evidencias de que otros módulos citoplásmicos de la proteína son también capaces de percibir el estímulo (Georgellis *et al.*, 2001, Kwon *et al.*, 2000, Malpica *et al.*, 2004, Swem *et al.*, 2003); entre ellos, el dominio PAS (Taylor and Zhulin., 1999, Taylor *et al.*, 2001). Otros módulos son capaces de transmitir los cambios conformacionales al dominio citoplásmico como el dominio HAMP (Gong *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 1999, Aravind and Pointing., 1999, Neiditch *et al.*, 2005, Neiditch *et al.*, 2006). El reconocimiento del estímulo permite la autofosforilación de la CS en un residuo de His conservado en el dominio catalítico que se denomina dominio transmisor. Posteriormente, la CS-

fosforilada cataliza la trans-fosforilación al RR específico en un residuo de Asp conservado dentro de la misma molécula. La fosforilación del RR generalmente produce un cambio conformacional en la proteína y la activa para unirse con otra proteína (Barak and Eisenbach., 1992) o funcionar como un regulador transcripcional ya que la región carboxilo terminal suele presentar un dominio hélice-vuelta-hélice, característico de proteínas que se unen al DNA (Suzuki *et al.*, 2002, Sganga and Bauer 1992, Cotter *et al.*, 1997. Linch and Linn., 1996, Iuchi and Lin., 1988).

Algunos de los SDC descritos no presentan esta estructura típica y son estructuras más complejas, por ejemplo la transmisión de la señal puede requerir cinasas sensoras tripartitas (Georgellis *et al.*, 1997, Hbarak and Willis 1992, Nagasawa *et al.*, 1992, Simona *et al.*, 1994, Stevens *et al.*, 1992, Utsumi *et al.*, 1994, Uhl and Miller., 1996) o varias proteínas que participen en el fosforrelevo, como es el caso del sistema Spo en *Bacillus subtilis* (Hoch JA., 1993b). Las CS tripartitas presentan tres dominios involucrados en la transferencia del grupo fosfato a través del fosforrelevo, y una vez activada la misma, cataliza la fosforilación en un residuo de Asp conservado dentro de la molécula RR. En el SDC BarA/UvrY, la CS es BarA, y su RR es UvrY, el cual está involucrado en la regulación del metabolismo de carbono y virulencia. BarA pertenece al grupo de CS tripartitas, ya que presenta tres módulos para el fosforrelevo. En la figura 1 se esquematiza la proteína BarA, con sus tres dominios involucrados en el fosforrelevo.

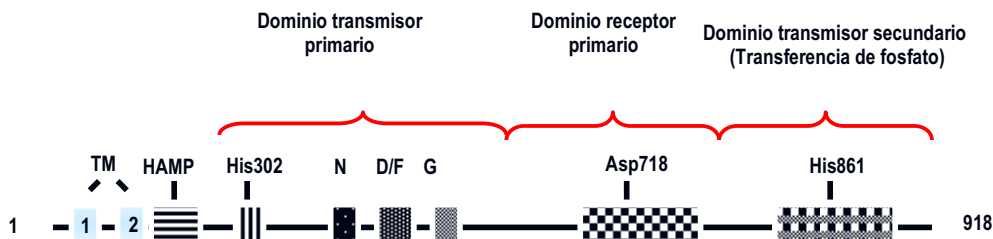


Figura 1. Estructura de la CS tripartita BarA de *E. coli*. Se muestran los dominios transmembranales (TM), y los tres dominios involucrados en el fosforrelevo: transmisor primario, receptor primario y transmisor secundario. En el dominio transmisor primario se muestra la His-302 conservada y el sitio catalítico de unión a ATP (cajas N, D/F y G. G es el sitio de unión del ATP. El dominio receptor se muestra con el Asp-718 conservado y en el dominio transmisor secundario destaca la presencia de la His-861 conservada. Los residuos conservados se encuentran relacionados con el fosforrelevo (Pernestig *et al.*, 2001).

Los dominios que forman la CS se denominan dominio transmisor primario, donde se localiza la primera histidina conservada, subsecuentemente se encuentra el dominio receptor primario, que presenta un aspártico conservado y finalmente se localiza el dominio transmisor secundario, donde destaca la segunda histidina conservada. Al igual que otros SDC (Kwon *et al.*, 2000, Georgellis *et al.*, 1997, Uhl and Miller., 1996, Perraud *et al.*, 1998), se piensa que BarA tras su activación es fosforilada, para posteriormente transferir el grupo fosfato a los dos dominios subsecuentes en los aminoácidos conservados, receptor primario y transmisor secundario, y finalmente fosforilar a su RR UvrY (Pernestig *et al.*, 2001) el cual regula la expresión de genes blanco (Figura 2), los cuales serán revisados más adelante.

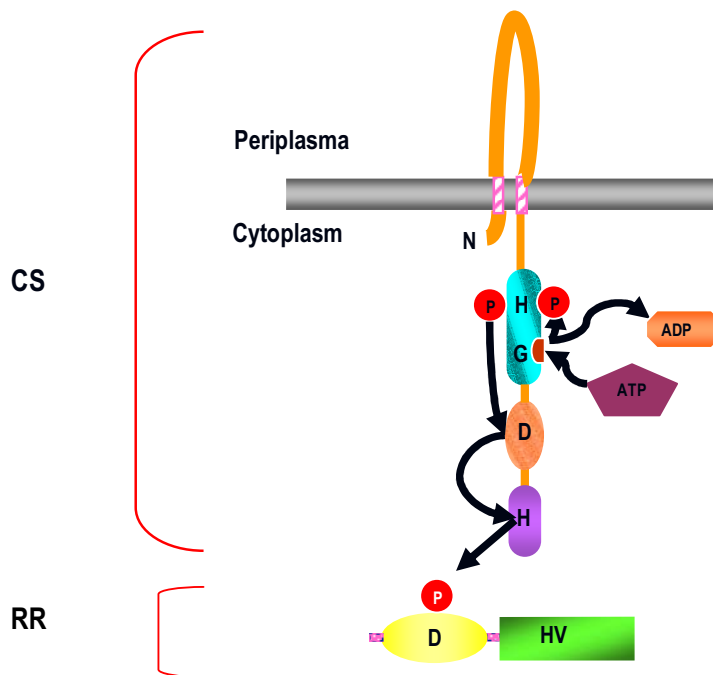


Figura 2. Fosforilación en el sistema BarA/UvrY en *Escherichia coli*. La CS se muestra con su región periplásmica, sus dos segmentos transmembranales y sus tres dominios citoplásmicos. El ATP se une en la caja G, lugar donde se hidroliza. El grupo fosfato es transferido a la H, D, H y finalmente al D del RR.

Las señales identificadas por la CS pueden ser abióticas o bióticas; algunas señales son producidas por el huésped, mientras que otras son sintetizadas por la población microbiana. Las señales producidas en cooperación con la densidad poblacional aseguran el mecanismo regulatorio conocido como *quorum*

sensing (QS) (Bassler BL., 1999; Hoch JA., 2000, Holden *et al.* 2000). En muchos de los casos de SDC, la señal que detectan es aún desconocida.

Las proteínas BarA/UvrY se encuentran en *Escherichia coli* y se han descrito ortólogos entre la Subdivisión γ de las Proteobacterias. Algunas de las bacterias en las que se ha detectado este SDC son causa de una gran cantidad de enfermedades humanas y daño agrícola. Entre los géneros reportadas con sistemas ortólogos a BarA/UvrY se encuentran *Pseudomonas* con el sistema GacS/GacA, ExpS/ExpA para *Erwinia*, VarS/VarA para *Vibrio* y BarA/SirA para *Salmonella*. En todas estas especies se ha reportado una función común, la activación de RNAs pequeños (sRNA) y la regulación de la proteína CsrA involucrada en metabolismo del carbono y en metabolismo secundario. En algunas de estas especies se ha reportado su función en la regulación de genes de virulencia.

A la fecha no se conoce todo el regulón bajo el control del sistema BarA/UvrY, sin embargo se han descrito tres genes que son regulados por este sistema: *csrB*, *csrC* (Suzuki *et al.*, 2002, Weillbacher *et al.*, 2003) y *rpoS*, aunque la activación de este último es controversial (Sugiura *et al.*, 2003, Mukhopadhyay, *et al.*, 2000, Hengge-Aronis R., 2002, Oshima *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2003, Susuki *et al.*, 2002). Por otra parte, mutantes en *barA* y *uvrY* han mostrado alteraciones en la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (Pernestig *et al.*, 2001). Mutantes en *uvrY* han mostrado aumento en la sensibilidad a nitrofurazona polimixina B y dihidrostreptomocina; un incremento de resistencia a la hidroxilamina y una mayor utilización de la D-melobiosa. Actualmente, no se ha demostrado la regulación de los genes involucrados en estas características fenotípicas (Zhou *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2

EL SISTEMA BarA/ UvrY

2.1.- Descripción de Bar A

La cinasa sensora BarA, fue descrita por primera vez en *Escherichia coli* por su similitud y habilidad de complementar una mutación en la CS EnvZ, la cual regula la expresión de proteínas de membrana externa. Los autores la nombraron BarA a partir del inglés Bacterial Adaptive Response Gene A, por estar involucrada en la respuesta adaptativa. Así mismo, se mostró *in vitro* su capacidad de fosforilación en presencia de ATP (Nagasawa *et al.*, 1992).

2.1.1.- Dominios Funcionales en BarA

Como se mencionó, la proteína BarA es una CS, de 918 aminoácidos. La parte citosólica se caracteriza por la presencia de un dominio PAS, un dominio HAMP, y los tres dominios ya descritos.

Con base en la presencia de los aminoácidos conservados y en la semejanza estructural de BarA con otros SDC, se piensa que la fosforilación de este sistema se lleva a cabo de forma semejante a otros descritos (Perraud *et al.*, 1998, Georgellis *et al.*, 1997, Burbulys *et al.*, 1991, Jourlin *et al.*, 1997, Posas *et al.*, 1996.). Se ha demostrado que la CS BarA fosforilada, transfiere el grupo fosfato al RR citoplásmico UvrY (Pernestig *et al.*, 2001). La fosforilación de los residuos conservados intervendrían en la catálisis del fosforrelevo de acuerdo a la secuencia His → Asp → His → Asp. El residuo de Asp final, se encuentra en el RR UvrY.

Como ya se mencionó, se ha propuesto la presencia de los dominios HAMP y PAS, en BarA. Las siglas del dominio PAS provienen del acrónimo en inglés de las proteínas de *Drosophila* period clock protein (PER), vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), y *Drosophila* single-minded

protein (SIM) (Taylor and Zhulin., 1999, Taylor *et al.*, 2001). Teóricamente, el dominio PAS se encuentra entre los residuos de aminoácidos 200 y 350 de la proteína BarA. Los dominios PAS, son módulos que perciben el oxígeno, la luz, el potencial redox y la fuerza protomotriz, como una forma de monitorear la energía. Se distribuyen ampliamente en las bacterias, las arqueas y los eucariontes y están frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales (Taylor and Zhulin., 1999, Taylor *et al.*, 2001). Se ha encontrado un 30% de similitud entre el dominio PAS y la proteína BarA, y actualmente no se ha descrito una función de este dominio hipotético en dicha proteína (Sahu *et al.*, 2003).

El dominio HAMP (Histidine kinase Adenyl cyclase, Methyl binding proteins, Phosphatases) (Aravind and Pointing., 1999) se sobrelapa con el hipotético dominio PAS, entre los aminoácidos 200 y 252. El dominio HAMP se ha descrito en proteínas sensoras y en histidina cinasas eucarióticas. Generalmente estas proteínas forman parte de sistemas de dos componentes en proteínas integrales de membrana (Grebe and Stock., 1999; Ishige *et al.*, 1994). Anteriormente se había sugerido un papel funcional del dominio HAMP como transmisor de la señal entre el dominio periplásmico y el dominio transmisor H1 de BarA (Appleman and Stewart., 2003). Recientemente se ha mostrado que mutaciones puntuales en este dominio impiden el cambio conformacional de BarA inducido por el reconocimiento de la señal, lo que impide la actividad cinasa del sensor (Tomenius *et al.*, 2005). De manera general, en las CS con dominio HAMP, es posible que éste juegue un papel importante en la correcta transmisión de la señal desde el dominio periplásmico a los tres dominios citosólicos a través de los cambios conformacionales que impone a la molécula (Tomenius *et al.*, 2005, Khorchid and Ikura., 2006) .

El alineamiento de la secuencia del dominio periplásmico entre las CS ortólogas ha mostrado que existen dos grupos de cinasas, las de enterobacterias y las de pseudomonaceas, lo que permite hipotetizar que las señales de activación para estos dos grupos de CS serían diferentes.

2.1.2.- Funciones de BarA

Respuesta ante el estrés ambiental

BarA ha sido relacionada con la respuesta a ambientes ácidos. Posiblemente el pH juega un papel regulador en su activación, ya que se ha demostrado que en condiciones de acidez, los metabolitos intestinales producidos por los enterocitos (Wolfe AJ., 2005) juegan un papel en la activación del sistema BarA/SirA en *Salmonella* (Lawhon *et al.*, 2002), el cual una vez activado induce la expresión de genes blanco.

Las bacterias entéricas han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir bajo las presiones de acidez y de las sales biliares que encuentran a su paso. Las sales biliares son fluidos antimicrobianos potentes que causan cambios en la presión osmótica (Sahu *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las porinas adecuan a las bacterias a los cambios osmóticos causados por las sales biliares. Por ejemplo, se sabe que BarA activa el RR OmpR en mutantes de la CS EnvZ (Nagasawa *et al.*, 1992), lo que permite su sobrevivencia en cambios de osmolaridad, al permitir la expresión de las porinas OmpF y OmpC. Sin embargo, se desconoce si la expresión de las porinas vía BarA, ocurre in vivo aun en presencia de EnvZ. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium crecida en presencia de sales biliares, disminuye notablemente su capacidad de invasión en células epiteliales, a través de los genes de regulación *sirC* que controlan la expresión de islas de patogenicidad (Prouty and Gunn., 2000).

El sistema de dos componentes BarA/SirA de *Salmonella*, controla la expresión de *sirC*. Estos datos han sugerido que la presencia de sales biliares, bloquean la activación del sistema BarA/SirA y esto a su vez regula negativamente la expresión de *sirC*, controlando de esta forma la expresión de genes de invasión del patógeno (Johnston *et al.*, 1996). Aparentemente esto se llevaría a cabo en el lumen del intestino, lugar donde hay una mayor concentración de sales biliares, además de la vesícula biliar. Sin embargo, una vez que la bacteria atraviesa la capa de mucosa intestinal, la concentración de sales biliares

disminuye, lo que permitiría la expresión de genes de invasión controlados por *sirC* (Prouty and Gunn., 2000).

El papel de BarA en la formación de biopelículas.

Las poblaciones microbianas suelen formar comunidades de una o varias especies organizadas en matrices que protegen a los microorganismos de agentes antimicrobianos y proveen a la comunidad de un microambiente estable. Estas comunidades reciben el nombre de biopelículas y se caracterizan porque su estructura se encuentra formada por canales y pilares por donde fluyen los nutrientes y salen los desechos orgánicos de la comunidad. Una biopelícula se inicia por la adherencia de células individuales a una superficie seguido de la migración y replicación de los microorganismos para formar microcolonias, las cuales eventualmente formarán un biopelícula madura (O'Toole and Kolter., 1998, Pratt and Kolter., 1999).

Se ha descrito una relación entre la disponibilidad de nutrientes y la formación de biopelículas, así como la presencia de algunos tipos de pili (Davey and O'Toole., 2000), como requisitos para la iniciación de la formación de este tipo de comunidades microbianas. Por ejemplo, en el caso de *E. coli*, se requiere de la presencia de pili tipo I y el flagelo para iniciar la formación de este tipo de matrices a partir de la síntesis de exopolisacáridos. En *Pseudomonas aeruginosa*, se ha demostrado el papel del SDC GacS/GacA, en la formación de bio película, y de los flagelos y pili tipo IV en la adherencia como requisito inicial para su formación (O'Toole and Kolter., 1998). En *E. coli*, se ha demostrado el papel de BarA en la formación de este tipo de comunidades. Mutantes en *barA* muestran una capacidad disminuida en la formación de biopelículas (Sahu *et al.*, 2003).

El sistema BarA/UvrY activa la transcripción de los genes *csrB* y *csrC*, los cuales regulan a su vez la actividad de la proteína CsrA (Suzuki *et al.*, 2002, Weilbacher *et al.*, 2003). CsrA pertenece al sistema de regulación de carbono (carbon storage regulator) y es codificada por el gen *csrA*. Igualmente la proteína CsrA, ha sido relacionada en la formación de biopelículas en *E. coli*.

Mutaciones en *csrA* inducen la formación de biopelículas (Romeo *et al.*, 1993, Jackson *et al.*, 2002). Si embargo, no se ha descrito una relación directa entre BarA/UvrY y la formación de biopelículas (Jackson *et al.*, 2002; Parkins *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Teplitski & Ahmer, 2004). Por otra parte, mutaciones en BarA y su ortólogo GacS, no pierden totalmente la capacidad para formar biopelículas.

La formación de biopelículas ha sido relacionada con la patogenicidad como un mecanismo importante que desencadena infecciones sistémicas a partir de células individuales, que se desprenden de la comunidad. Debido a su estructura que protege del acceso de los antibióticos a su interior, y que permite su adherencia a superficies, se acentúa el riesgo de infecciones sistémicas en el uso de tubos y catéteres en la práctica médica e implantes de injertos (Padera RF., 2006, Soto *et al.*, 2006). Recientemente, se ha hipotetizado un papel importante de estas estructuras en patogenicidad en *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (FQ) (O'may *et al.*, 2006).

Los resultados experimentales no permiten concluir el papel directo de BarA en la formación de biopelículas, por lo que el mecanismo de su participación tendrá que ser evaluada. Asimismo, la función de la formación de películas en patogenicidad para cada una de las especies descritas no es clara y conclusiva.

Papel de BarA en la patogenicidad

El papel de BarA en patogenicidad, se describió a partir de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno registrado en las mutantes BarA. Se ha demostrado una disminución en la actividad de las catalasas G y E en estas mutantes. La expresión de los genes que codifican estas dos catalasas se encuentra bajo la regulación de RpoS, y algunos resultados experimentales sugieren que el control está mediado por el incremento de la expresión de *barA* en la fase exponencial (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Sin embargo, estos resultados son controversiales, ya que en ensayos de microarreglos, no se observa una regulación de *rpoS* por este sistema (Oshima *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2003).

Los microorganismos patógenos requieren de hierro para llevar a cabo sus mecanismos de patogenicidad, y las alteraciones de la regulación del metabolismo del hierro disminuyen la virulencia. Mutaciones en el gen *barA* eliminan la habilidad de *E. coli* uropatógenas para producir sideróforos y receptores de membrana que regulan la internalización del hierro, además de que pierden su habilidad para crecer en la orina. Con base en estos resultados, se ha sugerido que BarA puede regular la adquisición de hierro en cepas uropatógenas y que juega un papel importante en la colonización durante la infección del tracto urinario (Zhang and Normarck., 1996). Sin embargo, este fenotipo parece ser específico de esta cepa, ya que en la cepa MC4100 de *E. coli*, las mutantes en *barA* crecen igual que cepas silvestres en medios con bajas concentraciones de hierro (Pernestig *et al.*, 2001).

Recientemente se ha involucrado a la proteína BarA en la regulación de virulencia en *E. coli* 078:K80:H9 (*E. coli* patógena de aves APEC), demostrándose el papel de este gen en la regulación de la expresión de fimbrias, susceptibilidad al estrés oxidativo y viabilidad en embriones de pollo (Herren *et al.*, 2006). Igualmente se ha demostrado el papel de BarA/uvrY en virulencia en modelos de infección urinaria en chimpancés (Tomenius *et al.*, 2006). Mutantes en *barA* y *uvrY*, mostraron virulencia reducida en este modelo.

Por otro lado, se ha demostrado que los ortólogos de la proteína BarA de *E. coli*, tales como GacS de *Pseudomonas* y BarA de *Salmonella*, juegan papeles importantes en virulencia (Goodman *et al.*, 2004. Jones BD 2005. Teplitski *et al.*, 2003). Por ejemplo, mutantes en GacS han mostrado virulencia reducida en modelos de fitopatogenicidad por *P. fluorescens* y patogenicidad en animales por *P. aeruginosa*. Por otra parte BarA de *Salmonella* activa la expresión de HilA, proteína que regula la expresión de genes de islas de patogenicidad como SPI1, SPI4 y SPI5 (Johnston *et al.*, 1996., Ahmer BM., 1999). Sin embargo, se ha propuesto que HilA puede activarse por otros mecanismos independientes de sistemas de dos componentes (Ellermeier *et al.*, 2005, Jones BD 2005), lo que sugiere una regulación de la expresión de genes de virulencia más compleja.

De la misma manera, el sistema BarA/SirA en *Salmonella*, se requiere para la expresión de los genes de invasión de la isla SPI-1, ya que en mutantes *barA* se disminuye notablemente la virulencia en modelos de ratón. En este estudio se pensó en la posibilidad de algún metabolito presente en el medio que permite la activación del sistema y se sugirió a los ácidos grasos de cadena corta como activadores de SirA (Lawhon *et al.*, 2002). Este estudio sugiere la activación directa de SirA independiente de BarA, a través del acetil fosfato.

2.2.- Descripción de UvrY

El RR complementario de BarA es la proteína UvrY (Moolenaar *et al.*, 1987., Pernestig *et al.*, 2001), su nombre proviene del ligamiento estrecho que tiene con el gen *uvrC*, ya que se encuentran dentro del mismo operón y en el transcrito bicistrónico del mRNA (Donnenberg and Kaper., 1991). *uvrC* codifica para una subunidad de la enzima UvrABC que está involucrada en reparación del DNA (Linn and Sancar., 1992). La proteína UvrY fue descrita en *E. coli* K-12 como el RR funcional de BarA demostrándose la transferencia de fosfato (Pernestig *et al.*, 2001). La primera evidencia genética de que UvrY es el RR funcional de BarA, proviene del hallazgo de que mutantes en *barA* y *uvrY* presentan un fenotipo semejante de hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno.

Actualmente se ha demostrado que mutaciones en el gen *barA* afectan directamente la regulación de las vías glucolíticas y gluconeogénicas a través de los genes *csrB* y *csrC* (Pernestig *et al.*, 2003), ambos regulados por el sistema BarA/UvrY. Además, existen otras evidencias genéticas que muestran que mutaciones en el gen *barA* afectan la activación de su par funcional UvrY (Tomenius *et al.*, 2005). Por otra parte, a la proteína UvrY se le ha asociado con la regulación de la movilidad, formación de biopelículas, y el control en las vías glucolíticas y gluconeogénicas (Figura 4) (Teplitzki *et al.*, 2003, Pernestig *et al.*, 2003, Jackson *et al.*, 2002. Pernestig *et al.*, 2001).

UvrY posee la estructura clásica de un RR; un dominio receptor del grupo fosfato en el Asp conservado en la posición 54 y un dominio efector hélice-vuelta-hélice (HVH) de unión a DNA (Figura 3).

Los ortólogos de UvrY descritos para especies patógenas como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Salmonella* y *Vibrio* se han involucrado en el metabolismo secundario y/o la virulencia.

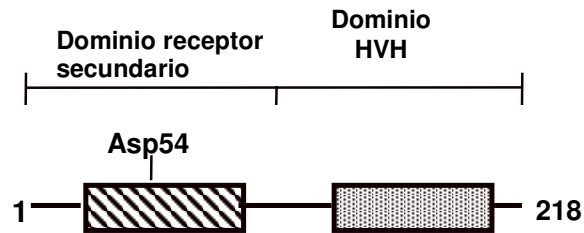


Figura 3. Se muestra la proteína UvrY con su dominio receptor N-terminal. En el esquema se muestra el residuo de Asp-54 conservado con función en la fosforilación a partir de BarA. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio hélice-vuelta-hélice (HVH), generalmente de unión al DNA, para la regulación de la transcripción (Pernestig *et al.*, 2001).

Estos 5 genes (*sirA*, *varA*, *gacA*, *expA* y *uvrY*) son ortólogos basados en los siguientes criterios: están altamente conservados (muestran al menos 60% de identidad en la secuencia de aminoácidos) y el contexto genómico de cada gen está conservado (cada uno está localizado directamente río arriba del gen *uvrC*). Los genes reguladores se encuentran antecediendo al gen de *uvrC* en un transcrito bicistrónico, tal que el ORF de *uvrC* se sobrepone en un pequeño fragmento del gen del RR. Sin embargo, mutaciones en *uvrY* de *E. coli* y *expA* de *E. carotovora* no afectan el sistema de reparación de escisión de nucleótidos (Moolenaar *et al.*, 1987, Eriksson *et al.*, 1998).

Por otra parte, estos ortólogos muestran entre sí una identidad considerablemente alta (Pernestig *et al.*, 2001) (Tabla 1), además de que todos codifican para RR de SDC de la familia FixJ.

	UvrY <i>E.coli</i>	SirA <i>S. typhimurium</i>	ExpA <i>E. carotovora</i>	VarA <i>V. cholerae</i>	GacA <i>P. aeruginosa</i>
UvrY <i>E.coli</i>	100%	96%	82%	75%	60%
SirA <i>S. typhimurium</i>		100%	83%	76%	60%

ExpA <i>E. carotovora</i>			100%	72%	59%
VarA <i>V. cholerae</i>				100%	61%
GacA <i>P. aeruginosa</i>					100%

Tabla 1. Identidad entre las proteínas ortólogas de UvrY de diferentes especies de γ proteobacterias (Pernestig et al., 2001).

La complementación genética de mutantes en *expA* de *E. carotovora* con *uvrY* de *E. coli*, ha enfatizado la relación entre estos reguladores (Eriksson et al., 1998). Se ha demostrado que mutaciones en *uvrY* y sus ortólogos producen alteraciones en la movilidad o en la regulación de los genes involucrados en movilidad, lo que sugiere un control a nivel del regulón flagelar como una función evolutivamente conservada en este grupo de ortólogos (Goodier and Ahmer., 2001).

2.2.1.- Genes regulados por BarA/UvrY

A la fecha se han descrito tres genes regulados por el sistema BarA/UvrY de *E. coli*: *csrB*, *csrC* y *rpoS*. La regulación de *rpoS* por el sistema BarA/UvrY es controversial (Sugiura et al., 2003, Mukhopadhyay, et al., 2000, Hengge-Aronis R., 2002, Oshima et al., 2002, Zhou et al., 2003, Susuki et al., 2002).

Los dos primeros genes son componentes del sistema de regulación de carbono Csr Csr y su homólogo, Rsm que ha sido descrito en *Pseudomonas* spp. y *Erwinia* (*Repressor of stationary phase metabolites*), forman parte de un sistema de regulación global que controla numerosos genes y procesos transcripcionalmente (Romeo T., 1998, Valverde et al., 2003, Liu et al., 1998).

En el sistema Csr, el componente principal es la proteína CsrA, formada por 61 aminoácidos. CsrA, se caracteriza por ser una proteína de unión a RNA que puede modular la expresión de los transcritos alterando la estabilidad de los mRNA blanco (Figura 4). *csrB* y *csrC* son RNAs pequeños (sRNAs) y forman parte del sistema Csr, regulando la función de CsrA. La regulación de sRNAs no traducidos es la única función conservada, regulada por BarA/UvrY, que se ha encontrado en las especies que presentan ortólogos de los genes que codifican para estas proteínas.

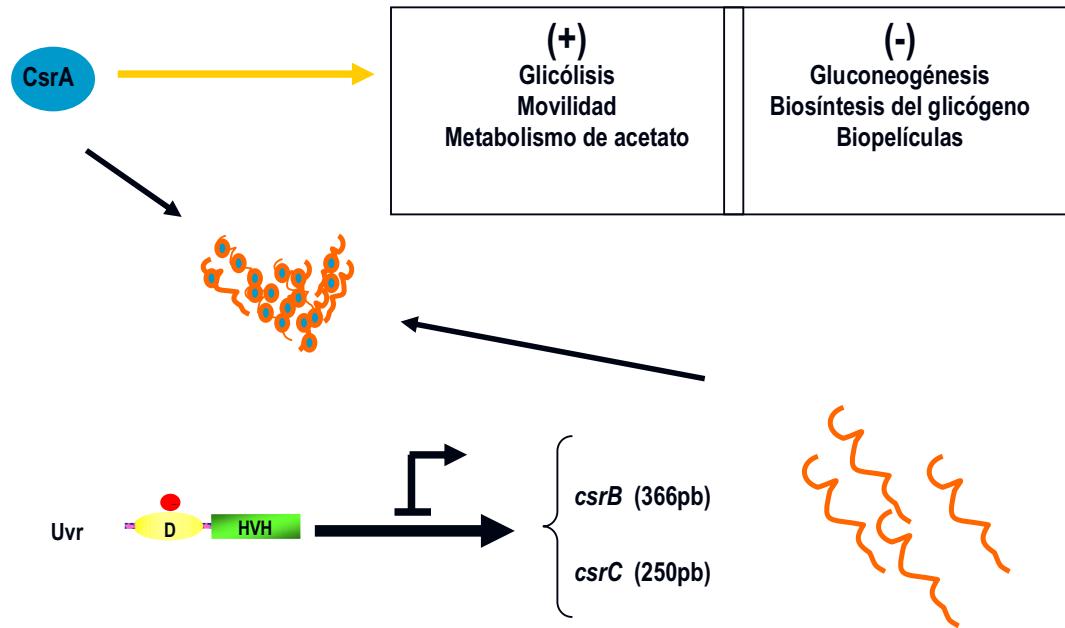


Figura.4. Genes regulados por el sistema BarA/UvrY. *csrB* y *csrC* son los únicos genes que se han descrito regulados por este sistema. *csrB* y *csrC* antagonizan la función de CsrA, inhibiendo la glucólisis, movilidad y metabolismo del acetato. Por el contrario, la titulación de CsrA por *csrB* y *csrC*, promueven la gluconeogénesis, biosíntesis del glucógeno y formación de biopelículas.

Por otra parte, se ha demostrado que en *P. fluorescens* el sistema Rsm participa en el control de la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Reimmann *et al.*, 2005) y este mismo sistema en *Erwinia* regula la expresión de genes de virulencia (Cui *et al.*, 1999). Además Csr regula la invasión de células epiteliales en *Salmonella enterica* y afecta el swarming en *Proteus mirabilis* (Liaw *et al.*, 2003) y *Legionella pneumophila* (Fettes *et al.*, 2001).

En *E. coli*, se ha relacionado al sistema Csr con la represión de varios procesos en la fase estacionaria y con la activación de algunas funciones en la fase exponencial (Romeo T, 1998). Se ha demostrado que CsrA es un activador de la glucólisis, metabolismo de acetato y biosíntesis del flagelo (Wei *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2001, Jackson *et al.*, 2002, Romeo *et al.*, 1993). CsrA reprime algunos procesos como la gluconeogénesis, el metabolismo del glucógeno, e inhibe la formación de biopelículas (Romeo *et al.*, 1993, Sabnis *et al.*, 1995, Jackson *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2005) (Figura 4). CsrA se une en la región cercana a la secuencia Shine Dalgarno en los transcritos, bloqueando el acceso del ribosoma al mensajero (Baker *et al.*, 2002).

En *E. coli*, se han descrito 4 componentes del sistema Csr: CsrA, dos sRNAs no traducibles *csrB*, *csrC* y CsrD (Welbacher *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 1997) una proteína que ayuda a la RNasa E a reclutar el RNA de *csrB* y *csrC* al degradosoma, (Suzuki *et al.*, 2006). Cada uno de los miembros del sistema Csr se describirán a continuación. En *V. cholerae* se ha descrito otro sRNA, *csrD* (Lenz *et al.*, 2005). Esto sugiere que el sistema Csr se encuentra formado por una serie de sRNAs controlados por el sistema BarA/UvrY y sus ortólogos.

El sistema regulatorio de CsrA, ha sido descrito en proteobacterias de la subdivisión alfa y gama y en bacterias gram positivas, por lo que parece ser un sistema ampliamente distribuido entre las eubacterias (White *et al.*, 1996).

CsrA regula negativamente la expresión de *glgC*, un gen involucrado en la biosíntesis del glucógeno, uniéndose al transcrito de *glgCAP* (Baker *et al.*, 2002). Igualmente, se ha reportado que reprime la traducción de *cstA*, un gen inducido en inanición e involucrado en transporte de péptidos (Schultz and Martin 1991, Dubey *et al.*, 2003), al igual que el operón que está formado por un grupo de genes que son requeridos para la síntesis de poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina (PGA), adhesina que participa en la formación de biopelículas (Wang *et al.*, 2005).

Las secuencias de los transcritos donde se une CsrA, muestran elementos conservados secuencias como las secuencias GGA ACA, y GU, las cuales parecen ser críticas para la unión de CsrA a la estructura secundaria de los transcritos. El complejo formado regula los niveles de traducción (Liu and Romeo 1997, Baker *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005, Dubey *et al.*, 2005).

Los genes *csrB* *csrC*

Los genes *csrB* y *csrC* están formados por 366 y 245 nucleótidos respectivamente. Ambos, antagonizan la función de CsrA al formar un complejo riboprotéico con ésta (Liu *et al.*, 1997) e inhibir su actividad bloqueando su interacción con los mRNA blanco. *csrB* y *csrC* presentan varias secuencias

repetidas AGGA y AGGGA (18 en *csrB* y 9 en *csrC*), que funcionan como sitios de unión con CsrA (Liu and Romeo 1997, Liu *et al.*, 1997 Gudapaty *et al.*, 2001; Weilbacher *et al.*, 2003). Estas secuencias se encuentran localizadas principalmente en los rizos de la estructura que forma el RNA. Estudios *in vitro* e *in vivo*, han mostrado que *csrB* y *csrC* funcionan como antagonistas de CsrA, aparentemente secuestrando esta proteína (Figura 4) (Gudapaty *et al.*, 2001, Liu and Romeo., 1997, Liu *et al.*, 1997).

Se ha asumido que CsrA tiene un papel indirecto en la regulación de la expresión de *csrB* y *csrC* (Gudapaty *et al.*, 2001, Suzuki *et al.*, 2002). En especies de *Pseudomonas* y *Erwinia*, el homólogo de *csrB* es *rsmZ* (Blumer *et al.*, 1999, Heeb *et al.*, 2002), y se encuentra regulado a su vez por GacS/GacA y ExpS/ExpA respectivamente. Mutaciones en las CS o los RR de estos organismos, afectan la expresión de *csrB* y sus homólogos (Ciu *et al.*, 2001, Hyytiäinen *et al.*, 2001).

Dentro de la amplia gama de especies que conforman las proteobacterias, se han descrito homólogos para *csrB* y *csrC*, los cuales han sido predichos *in silico* (CSRNA_FIND) (Lenz *et al.*, 2005). El contexto genómico de *csrC* revela que este RNA se localiza siempre en la vecindad de los genes *yihI* y *yihA* (proteína putativa de unión a GTP; Lehoux *et al.*, 2003), los cuales flanquean a *csrC* en el cromosoma de *E. coli*. Un análisis similar para *csrB* ha revelado que este gen se encuentra en la vecindad del gen *syd* (proteína de unión a membrana) (Shimoike *et al.*, 1995). En *E. coli*, *csrB* se ha descrito con 15 motivos AGGA y 3 AGGGA, *csrC* con 17 AGGA y 2 AGGGA. En *V. cholerae* *csrD* se ha descrito con 13 motivos AGGA y 2 AGGGA, por lo que se ha señalado que el sistema Csr formado por *csrA*, *csrB*, *csrC* y *csrD* en *V. cholerae* funciona de manera semejante que en *E. coli*. Mutantes en *csrBCD* en *V. cholerae* han mostrado tener un papel importante en el regulón completo de quorum sensing (Lenz *et al.*, 2005), además de su regulación por VarS/VarA.

El sistema BarA/UvrY y sus ortólogos regulan la expresión de los sRNA *csrB*, *csrC* y *csrD* y sus homólogos *rsm* (Cui *et al.*, 2001), una vez que el sistema ha

sido activado. Igualmente, estos sRNAs controlan los niveles de CsrA libre. BarA/UvrY no regula la expresión de CsrA. Siendo ésta una característica común en las especies descritas (Suzuki *et al.*, 2002, Teplitski *et al.*, 2003, Teplitski *et al.*, 2006, Weilbacher *et al.*, 2003, Fortune *et al.*, 2006, Valverde *et al.*, 2003). La interacción de CsrA con los csrRNAs no ha sido demostrada en *S. enterica* serovar Typhimurium. Mutaciones en *csrB* y *csrC* en *S. enterica* serovar Typhimurium, han mostrado un papel regulatorio de estos dos transcritos en la expresión de los genes de la isla SPI1, relacionados con virulencia, específicamente con la expresión de invasividad (Fortune *et al.*, 2006).

El gen rpoS

El gen *rpoS* codifica para la subunidad sigma S de la RNA polimerasa y regula la expresión de genes de la fase estacionaria y en respuesta a estrés como privación de nutrientes, cambios de pH, cambios de osmolaridad y variaciones de tensión de oxígeno. El mecanismo de activación de *rpoS* por el sistema BarA/UvrY es controversial (Sugiura *et al.*, 2003, Mukhopadhyay *et al.*, 2000, Hengge-Aronis R., 2002, Oshima *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2003), pero se ha reportado que BarA se requiere para la inducción transcripcional de *rpoS* (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha reportado que mutantes en BarA incrementan la transcripción en *rpoS*, y mutantes en UvrY incrementan la estabilidad de la proteína σ^S (Sugiura *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que UvrY parece no estar involucrada en la activación de *rpoS* (Hengge-Aronis R., 2002), por lo que se sugiere que BarA activa *rpoS* a través de otro regulador de respuesta aún no identificado (Venturi V., 2003). Los resultados controversiales al respecto de la regulación de *rpoS* por el sistema BarA/UvrY, permiten concluir que actualmente, los únicos genes que se conocen que son regulados por este sistema son los sRNAs *csrB* y *csrC*.

Se ha sugerido que un común denominador en la activación del SDC BarA/UvrY y sus ortólogos, es el ambiente registrado por la bacteria durante

una infección, ya que se ha mostrado la producción de proteínas de secreción involucradas en patogénesis, tras la activación del sistema. Sin embargo, existen especies no patógenas de *Pseudomonas* que presentan el sistema GacS/GacA. En *Pseudomonas*, se ha referido que los sobrenadantes de cultivos obtenidos en la fase exponencial activan el sistema GacS/GacA (Zuber *et al.*, 2003). Por otra parte, en el caso de *Salmonella*, se piensa que ácidos grasos de cadena corta, podrían ser los desencadenantes de la activación del sistema, al parecer, los mismos son secretados por los enterocitos en el ambiente que enfrenta *in vivo* el microorganismo (Lawhon *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que este sistema es activo en ausencia de adherencia celular y en ausencia de cualquier organismo huésped, lo que sugiere la activación a través de algún componente químico soluble.

Es posible que el sensor BarA monitoree algunos productos metabólicos lo que representaría el estatus energético prevalente a través del sistema Csr. La habilidad para determinar la disponibilidad de fuente de carbono combinada con una rápida modulación de los pasos metabólicos generadores de una mayor energía, ciertamente podrían ser un factor clave para la adaptación exitosa y la sobrevivencia a través de la expresión genética y por lo tanto del comportamiento de la población completa. En la Tabla 2 se resume la regulación de algunos genes blanco por el sistema BarA/UvrY y sus ortólogos.

Especie	SDC	Genes blanco	Fenotipos
<i>Escherichia coli</i>	BarA/UvrY	<i>csrB</i> , <i>csrC</i>	<ul style="list-style-type: none"> Mutantes en <i>barA</i> y <i>uvrY</i> muestran sensibilidad al peróxido de hidrógeno (Pernestig <i>et al.</i>, 2001) y menor grado de virulencia (Tomenius <i>et al.</i>, 2006, Herren <i>et al.</i>, 2006)
<i>Salmonella typhimurium</i>	BarA/SirA	<i>hilA</i> , <i>hilC</i> , <i>hilD</i> , <i>invF</i> , <i>csrB</i> , <i>csrC</i> (Teplitzki <i>et al.</i> , 2003., Teplitzki <i>et al.</i> , 2006, Altier <i>et al.</i> , 2005, Fortune <i>et al.</i> , 2006)	<ul style="list-style-type: none"> Mutantes en <i>sirA</i> muestran virulencia reducida en modelo de gastroenteritis bovina (Ahmer <i>et al.</i>, 1999). <i>HilA</i> regula directa o indirectamente la expresión de genes de las islas de patogenicidad SPI1, SPI4, SPI5 (Johnston <i>et al.</i>, 1996., Ahmer <i>et al.</i>, 1999). <i>csrB</i> regula indirectamente el regulador maestro de los genes flagelares (<i>flhDC</i>) (Teplitzki <i>et al.</i>, 2003), y directamente a <i>hilA</i> (Teplitzki <i>et al.</i>, 2006)
<i>Erwinia carotovora</i>	ExpS/ExpA	<i>rsmB</i> (Liu <i>et al.</i> , 1998., Cui <i>et al.</i> , 2001), <i>rsmC</i>	<ul style="list-style-type: none"> Enzimas involucradas en virulencia como celulasas, pectato liasas y poligalacturonasas (Eriksson <i>et al.</i>,

		(Cui <i>et al.</i> , 1999)	1998, Frederick <i>et al.</i> , 1997).
<i>Vibrio cholerae</i>	VarS/VarA	<i>cT</i> , <i>TcpA</i> <i>csrB</i> , <i>csrC</i> , <i>csrD</i> (Wong <i>et al.</i> , 1998., Lenz <i>et al.</i> , 2005)	<ul style="list-style-type: none"> • Mutantes en <i>expA</i> muestran virulencia reducida en modelos de fitopatogenicidad (Eriksson <i>et al.</i>, 1998). • Toxina del cólera y <i>TcpA</i> (Wong <i>et al.</i>, 1998). • Mutantes <i>varA</i> muestran virulencia reducida en modelos de ratón (Wong <i>et al.</i>, 1998).
<i>Pseudomonas spp</i>	GacS/GacA	<i>rsmB</i> , varios genes involucrados en virulencia y en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana	<ul style="list-style-type: none"> • Mutantes en <i>gacA</i> muestran virulencia reducida en modelos de fitopatogenicidad y en animales. • Mutantes en <i>gacA</i> muestran Capacidad reducida en la formación de biopelículasfilm (Heeb and Haas., 2001 y referencias citadas). • Genes que codifican o involucrados en la producción de enzimas con importancia en patogenicidad, entre ellas; proteasa extracelular, fosfolipasa C, pectato liasa, celulasa, poligalacturonasa (Heeb and Haas., 2001 y referencias citadas). • N-Acil-Homoserinlactona, alginato, fenasina, antibióticos, cianuro de hidrógeno, piocianina (Heeb and Haas., 2001 y referencias citadas).

Tabla 2. Diferentes especies dentro del grupo de las γ proteobacterias poseen SDC ortólogos de BarA/UvrY. El sistema BarA/UvrY regula la expresión de algunos genes y fenotipos involucrados en virulencia (modificado de Pernestig *et al.*, 2001).

2.2.2.- Función de UvrY en *Escherichia coli*.

Recientemente se ha involucrado a UvrY en virulencia (Tomenius *et al.*, 2005., Herren *et al.*, 2006). Se ha demostrado que mutantes en *uvrY* en cepas APEC serotipo O78:K80-H9 muestran menor grado de adherencia e invasión en cultivos de fibroblastos embrionarios de pollo, además de presentar sensibilidad al suero (Herren *et al.*, 2006). Es posible que UvrY regule algunos determinantes de virulencia requeridos para las infecciones sistémicas, ya que mutantes en *uvrY* mostraron incapacidad de producir infecciones generalizadas en embriones de pollo (Herren *et al.*, 2006). Por otra parte, mutantes en *uvrY* han mostrado menor capacidad de provocar cistitis en chimpancés (Tomenius *et al.*, 2006). De acuerdo a los resultados experimentales con los que se cuenta actualmente, se sugiere que los determinantes de virulencia en *E. coli* podrían ser de naturaleza multifactorial, ya que no todos se encuentran regulados por BarA/UvrY.

CAPÍTULO 3

PAPEL DEL ACETIL-FOSFATO EN LOS SDC

En otros SDC, se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, el papel del acetil-fosfato (acetil-P), como donador directo del grupo fosfato hacia el RR (Dailey *et al.*, 1993, Danese *et al.*, 1995, Deretic *et al.*, 1992, Lukat *et al.*, 1992, Lynch and Lin., 1996, Peña-Sandoval *et al.*, 2005, Roggiani and Dubnau., 1993). En todos los casos la evidencia *in vivo* proviene de estudios en mutantes en la CS. Se ha mostrado que el Asp conservado en el RR es fosforilado por el acetil-P. Se ha sugerido que el acetil-P contribuye a mantener y/o aumentar los niveles basales de los RR en estado fosforilado (Malpica *et al.*, 2006).

En el sistema BarA/SirA en *Salmonella*, se ha sugerido el papel del acetil-P como donador del grupo fosfato hacia el RR (Lawhon *et al.*, 2002). Se piensa que el acetato producido por los enterocitos, contribuye de manera importante a la formación del acetil-P, el cual activaría de manera directa al RR SirA, de forma independiente a BarA. Dobles mutantes en BarA y AckA-Pta (enzimas involucradas en la producción de acetil-P), disminuyen considerablemente la virulencia en ratones.

CAPÍTULO 4

QUORUM SENSING

Quorum sensing (QS) es la regulación de la expresión genética en respuesta a las fluctuaciones de la densidad poblacional. Las bacterias que presentan el sistema QS producen y liberan sustancias químicas llamadas autoinductores, y la concentración de estas sustancias químicas está en función de la densidad poblacional. La detección de un umbral de concentración del autoinductor conlleva a la regulación de la expresión genética.

Tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas presentan el sistema QS para regular una serie de actividades funcionales. Estos procesos incluyen simbiosis, virulencia, competencia, conjugación, producción de antibióticos, movilidad, esporulación, y formación de biopelícula. En general, las bacterias gram negativas usan como inductores moléculas de homoserin lactonas aciladas (HSL), y las gram positivas, utilizan oligopéptidos. Los autoinductores son producidos por proteínas tipo LuxI. Los autoinductores tipo HSL se unen a proteínas tipo LuxR que son reguladores transcripcionales (Walters and Sperandio M., 2006). La comunicación por el sistema QS a través de autoinductores, se lleva a cabo intra e interespecíficamente.

La señal que desencadena el mecanismo al igual que los genes que se encuentran regulados es diferente en cada caso. Sin embargo, la habilidad de comunicación entre organismos, permite que las bacterias regulen coordinadamente la expresión genética y por lo tanto el comportamiento de la población completa.

El primer mecanismo de QS que se descubrió, fue en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, donde se determinó que el incremento en la densidad poblacional genera bioluminiscencia. Una vez que los niveles de HSL alcanzan concentraciones nanomolares suficientes para la activación de su receptor

LuxR, se activa la transcripción del operón *luxICDABE*, requerido para la bioluminiscencia (Hanzelka and Greenberg 1996; Schaefer *et al.*, 1996).

Varios estudios independientes han mostrado la actividad del sistema QS en *E. coli* y *Salmonella* como luxS/AI-2, AI-3/epinefrina/norepinefrina, indol, y el homólogo de LuxR, SdiA para llevar a cabo el señalamiento intercelular. La primera molécula de señalización se involucra en comunicación interespecífica, y la segunda en comunicación entre reinos (Walters and Sperandio M., 2006). Es posible que el hecho de que estos organismos posean el sistema quórum sensing, refleje un mecanismo de adaptación al ambiente gastrointestinal, y se piensa que permite la comunicación con otros miembros de la comunidad y con el huésped.

En el ambiente gastrointestinal, la bacteria puede sincronizar la expresión de productos que permiten la evasión de la respuesta inmunológica. El QS en bacterias patógenas permite un ataque concertado lo que conduce a la producción de factores de virulencia por la población completa lo que permite un ataque contra las defensas del huésped (Kievit and Iglewski., 2000). Se ha sugerido que el QS en cepas EHEC permitiría el control de la colonización en el tracto gastrointestinal (Anand and Griffiths., 2003).

Actualmente la detección del gen *sdiA* ha adquirido valor diagnóstico en salmonelosis (Halatsi *et al.*, 2006). Se desconoce el mecanismo fisiológico por medio del cual se activa el sistema BarA/UvrY, es probable que en *E. coli* el sistema BarA/UvrY se active mediante un mecanismo semejante a QS, como el descrito para LuxPQ en *Vibrio harveyi*, VarS/VarA en *Vibrio cholerae* (Lenz *et al.*, 2005), GacS/GacA en *Pseudomonas* (Kay *et al.*, 2006) BvgA/BgS en *Bordetella* (Mishra *et al.*, 2005) y para algunas bacterias gram positivas como *Streptococcus*, y *Staphylococcus* entre otras (Neiditch *et al.*, 2006, Saizieu *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 5

JUSTIFICACIÓN

Actualmente se desconoce la señal de activación para el sistema BarA/UvrY. De acuerdo a lo poco que se ha descrito sobre sus ortólogos, se podría sugerir la producción de algún metabolito celular como posible activador del sistema (Heeb *et al* 2002, Zuber *et al* 2003.). Considerando lo reportado para otros sistemas activados paralelamente por QS, se podría proponer la búsqueda de la señal en características tales como la de densidad poblacional y aspectos ambientales que pudieran estar relacionadas con la regulación del sistema.

La identificación de la señal o los aspectos ambientales que permiten la activación del sistema es uno de los aspectos más importantes a determinar en el conocimiento de la fisiología del sistema BarA/UvrY, ya que sus ortólogos descritos se han encontrado en especies de importancia médica y veterinaria y parecen estar directamente relacionados con la regulación de la expresión de genes que intervienen en la virulencia bacteriana. Dado que los mamíferos no poseen SDC, la contribución sobre la fisiología del sistema BarA/UvrY, podría contribuir de gran manera al diseño de terapias farmacéuticas y estrategias inmunológicas en microorganismos patógenos.

Con base en lo anterior, la presente investigación se centró en la búsqueda de las condiciones ambientales que modulan la activación del sistema BarA/UvrY.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Medios y condiciones de crecimiento.

La cepa bacteriana utilizada principalmente en este estudio fue la KSB837, su genotipo se describe en la Tabla 3. El crecimiento de las cepas se llevó a cabo en el medio Luria-Bertani (LB), que contiene por litro 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de bacto triptona. Salvo especificación, las células se crecieron en medio Konberg (1.1% K₂HPO₄, 0.85% KH₂PO₄, 0.6% extracto de levadura y 0.5% glucosa). Las concentraciones de los antibióticos utilizados fueron: ampicilina (Amp) 100µg/ml; kanamicina (Kan) 100 µg/ml y cloramfenicol (Cm) 33 µg/ml, en los casos indicados. A partir de cultivos de toda la noche, se hicieron diluciones a una densidad óptica de una DO_{600nm} de 0.05. Los cultivos aeróbicos se crecieron con agitación rotacional de 240 rpm a 37°C, salvo en los casos indicados.

6.2.- Efecto de microaerofilia sobre la actividad transcripcional de *csrB*.

Para los ensayos de activación en condiciones anaeróbicas, los cultivos se crecieron en frascos de fermentación en dos medios diferentes LB o Konberg (1.1 % K₂HPO₄, 0.85% KH₂PO₄, 0.6% de extracto de levadura, 0.5% de glucosa), a partir de cultivos de toda la noche e iniciando a una DO_{600nm} de 0.05. Los cultivos se mantuvieron por 6 horas, se tomaron muestras cada 30 minutos y se determinó la expresión del reportero *csrB-lacZ* por su actividad de β-galactosidasa.

6.3.- Efecto de la densidad poblacional sobre la actividad transcripcional de *csrB*.

A partir de cultivos de toda la noche, se realizó una dilución a una DO_{600nm} de 0.05 en LB y se crecieron las células hasta una DO_{600nm} de 0.5. A partir de este cultivo se realizaron diferentes concentraciones iniciales de DO_{600nm} en LB (0.1, 0.4, 0.6, y 0.8). Estos cultivos se mantuvieron por espacio de 6 horas, y se tomaron muestras cada 30 minutos para determinar el crecimiento y la actividad de β -galactosidasa.

6.4.- Efecto del pH sobre la actividad transcripcional de *csrB*.

Para los ensayos de efecto del pH sobre la activación del sistema, se partió de cultivos de toda la noche, se realizó una dilución DO_{600nm} de 0.05 en LB y se crecieron las células hasta una DO_{600nm} de 0.5. A partir de este cultivo, se prepararon diluciones iniciales de DO_{600nm} de 0.05 y se crecieron en los diferentes medios de LB amortiguados a distintos pHs. Se utilizaron las siguientes sales amortiguadoras: LB adicionado con 0.1 M de TAPS (N-Tris (ácido hidroximetil)-metil-3-aminopropanosulfónico, pH 8.0), MOPS (ácido morfolin propanosulfónico, pH 7.0), MES (ácido morfolineetanosulfónico, pH 6.0), u Homopipes (ácido homopiperazin-N,N'-bis 2etanosulfónico pH 5.0) y LB-HCl pH 5.0.

Las cepas ECL5002 y ECL5003 se crecieron en LB adicionado con 0.1 M MOPS (pH 7.4), 20 mM D-xilosa y 20 mM de L-de lactato como inductor, de acuerdo a lo reportado (Rodríguez *et al.*, 2004). Los cultivos anaeróbicos usados como controles, se crecieron en condiciones aneróbicas en un volumen de 5 ml con medio LB en agitación con una barra magnética.

6.5.- Efecto de la glucosa sobre la actividad transcripcional de *csrB*.

A partir de cultivos de toda la noche, se realizó una dilución DO_{600nm} a 0.05 en LB y se crecieron las células hasta una DO_{600nm} de 0.5. A partir de este cultivo, se prepararon diluciones iniciales de DO_{600nm} de 0.05 y se crecieron en LB-Homopipes pH 5.0 y LB-Homopipes pH 5.0 suplementado con glucosa al 0.2%.

6.6.- Cepas bacterianas y plásmidos.

Los plásmidos y las cepas bacterianas usadas en este estudio, se detallan con su genotipo en la Tabla 3. La cepa bacteriana usada con más frecuencia en este estudio fue la *E. coli* KSB837 que proviene de la MG1655. La cepa KSB837 presenta una fusión del gen *csrB* con *lacZ* (Gudapaty *et al.*, 2001). Las cepas ECL 5002 y ECL 5003 presentan las fusiones *cyd-lacZ* y *lldp-lacZ* respectivamente, y fueron reportadas con anterioridad (Kwon *et al.*, 2000). Los plásmidos pMX601 y pMX602 se construyeron a partir del pRS415 fusionando el gen *lacZ* con el promotor de *barA* y *uvrY* respectivamente. Primeramente se amplificaron los promotores de *barA* y *uvrY* por PCR a partir del DNA genómico de *E. coli* MG1655, usando los oligonucleótidos 5' – GGAATTCGAAAGTCTGATGG-3' y 5'–CGGGATCCTCAAAGGAATATCTCC-3' para *uvrY* y 5'–GGAATCCCGACCACGGCAGC-3' y 5'–CGGGATCCCATGGAGTTCCGTTATGGGAC-3' para *barA*. Los oligonucleótidos incluyen los sitios de restricción para *EcoR1* y *BamH1*, y amplifican 1.0 Kb río arriba del ATG de cada gen. De la amplificación por PCR se obtuvo un fragmento de 1.0 Kb, el cual fue eluído de un gel de agarosa y digerido. Los fragmentos digeridos fueron clonados entre los sitios de restricción *EcoR1* y *BamH1* del plásmido pRS415 (Simons R. 1987). De esta forma se construyeron los plásmidos pMX601 y pMX602 con las fusiones *barA-lacZ* y *uvrY-lacZ* respectivamente. Posteriormente, las fusiones fueron transducidas por el fago λRS45 (Simons *et al.*, 1987) a una cepa MC4100. La eficiencia de transducción fue corroborada en la cepa KSY009 con la fusión transcripcional del gen *uvrY*. Las colonias azules fueron probadas en su

actividad de β -galactosidasa, para determinar la expresión de *barA* y *uvrY* en la fase media exponencial y estacionaria.

Cepas, plásmidos y fagos	Descripción	Referencia
Cepas		
KSB837	CF7789 $\Delta(att-lom)::bla \phi(csrB^-lacZ)$ (Hyb) Amp ^r	Gudapaty S. 2001
ECL 5002	MC4100 $\lambda \phi(cydA^-lacZ)$	Kwon O. 2000
ECL 5003	MC4100 $\lambda \phi(ildP^-lacZ)$	Kwon O. 2000
IFC 601	MC4100 $\lambda \phi(barA-lacZ)$	Este trabajo
IFC 602	MC4100 $\lambda \phi(uvrY-lacZ)$	Este trabajo
IFC 603	CF7781	Este trabajo
HJT 144	KSB837 <i>barA::Kan^r</i>	Tomenius H. 2005
Plásmidos		
pRS415	<i>lacZ⁺ lacY⁺ bla⁺</i>	Simons, RW. 1987
pMX 601	pRS 415 <i>barA-lacZ</i> (1.0 kb rio arriba del ATG)	Este trabajo
pMX 602	pRS 415 <i>uvrY-lacZ</i> (1.0 kb rio arriba del ATG)	Este trabajo
pMX 602	pRS 415 <i>uvrY-lacZ</i> (1.0 kb rio arriba del ATG)	Este trabajo
pMX 603	pRS 414 <i>uvrY-lacZ</i> (1.0 kb rio arriba del ATG)	Este trabajo
Fago		
fago λ RS45	<i>'bla lacZ lacY⁺</i>	Simons RW , 1987

Tabla 3. Plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo.

6.7.- Determinación de la actividad β -galactosidasa.

La determinación de β -galactosidasa se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Miller (1972), que cuantifica la hidrólisis de *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) por la β -galactosidasa. La fórmula para calcular las Unidades Miller de β -galactosidasa es:

$$\frac{\text{Abs } 420 \text{ nm} - (1.75 * \text{Abs } 550 \text{ nm})}{(\text{T})(\text{V})(\text{DO}600\text{nm})}$$

Donde la absorbancia a 420 nm es la medición del producto de la actividad de β -galactosidasa; 1.75*Abs 550 nm es un factor de corrección para la

absorbancia de detritus celular a esta densidad óptica. T, se refiere al tiempo de reacción (15min); V al volumen en ml del cultivo de bacterias adicionado para cada reacción, y por último DO 600 nm es la medición de la densidad óptica del cultivo, en el momento de la toma de la muestra. Cada experimento se realizó por lo menos en tres ocasiones.

6.8.- Preparación de suero anti-UvrY e inmunodetección.

Se utilizó como inmunógeno a la proteína UvrY-6XHis (1-218) purificada y previamente descrita (Pernestig *et al.*, 2001). La producción de suero anti-UvrY se realizó en conejos machos New Zeland de 1.5 Kg de peso. Se realizaron cuatro retos con la proteína purificada de UvrY. En el primer reto se inoculó 1 mg de proteína emulsionada con adyuvante completo de Freud, vol a vol. Las inmunizaciones subsecuentes se realizaron con 0.5 mg de la concentración del antígeno emulsionado con adyuvante incompleto. Cada inmunización se hizo dejando 3 semanas de espacio entre ellas. Los conejos se sangraron por la oreja para la obtención de suero preimmune y después de cada inmunización. Los anticuerpos anti-BarA fueron donados por el Dr. O. Melefors. La especificidad de los anticuerpos se probó a través de Western blot, y se realizó de acuerdo a lo descrito (Tomenius *et al.*, 2005).

Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de marcas comerciales.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1.- Identificación de las condiciones ambientales que activan la CS BarA.

Se ha reportado que la expresión de *csrB* es inducida por BarA/UvrY (Suzuki *et al.*, 2002). Por lo tanto, utilizando la fusión transcripcional *csrB-lacZ* en el cromosoma de la cepa KSB837, la expresión de *csrB* se puede determinar por ensayos de β -galactosidasa.

Se sabe que el pH de un cultivo puede cambiar el metabolismo bacteriano, ya que en presencia de glucosa y limitación de oxígeno, se producen ácidos orgánicos que son excretados y disminuyen el pH. Por otra parte, el crecimiento en medios ricos en aminoácidos produce el efecto contrario por la producción de aminas. Este efecto, además del hecho de que el sistema BarA/UvrY es necesario para la regulación de las vías glucolíticas y gluconeogénicas, nos llevaron a explorar el efecto del pH sobre la activación del sistema BarA/UvrY.

Además, se exploraron algunas condiciones ambientales que pudieran activar al sistema BarA/UvrY o bien que induzcan la producción de la señal para su activación. Se probaron algunos ambientes tales como el crecimiento en glucosa en condiciones anaeróbicas, crecimiento aeróbico y anaeróbico en diferentes medios de cultivo, además de la activación del sistema dependiente de la densidad poblacional y del pH.

7.2.- Activación dependiente de la densidad poblacional inicial.

Se ha reportado en especies de *Pseudomonas* y *Vibrio* entre otras, la activación del sistema QS. Se ha demostrado que la activación del sistema GacA/GacS se lleva a cabo al final de la fase exponencial (Heeb *et al.*, 2002, Zuber *et al.*, 2003) en *Pseudomonas aeruginosa*. Al inicio de esta investigación,

se pensó que el sistema BarA/UvrY podría ser activado de forma dependiente de la densidad poblacional, de manera semejante a *Pseudomonas*, por el sistema QS, por lo que se determinó la activación del mismo a diferentes densidades poblacionales iniciales.

Los resultados no mostraron que el sistema BarA/UvrY se active de forma dependiente de la densidad poblacional inicial, ya que la activación del sistema se obtuvo en la fase media exponencial, en densidades ópticas mayores de 0.5. Este comportamiento se puede observar claramente cuando se parte de una densidad óptica inicial de 0.1 (Figura 5).

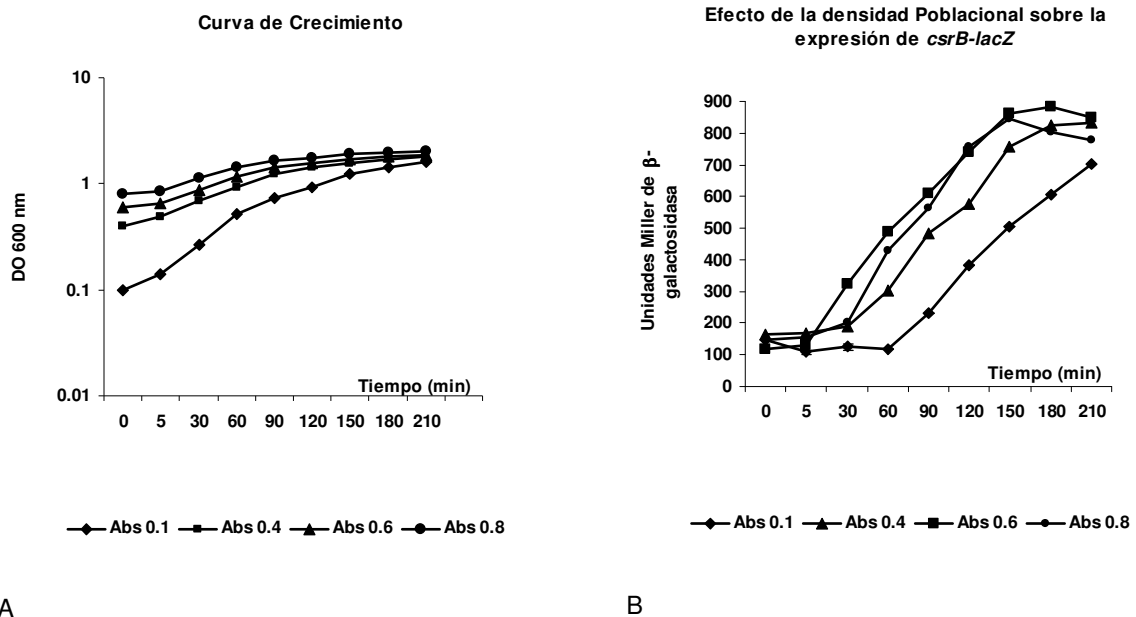


Figura. 5. Efecto de la densidad óptica inicial sobre la activación de BarA/UvrY y expresión de *csrB-lacZ*. Las células se crecieron a densidades ópticas iniciales crecientes (Abs) 0.1, 0.4, 0.6 y 0.8. Las muestras se tomaron cada 30 minutos, se registró su crecimiento (A) y determinó la actividad de β -galactosidasa (B) para cada uno de los cultivos en las diferentes densidades ópticas iniciales. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

7.3.- Activación en anaerobiosis.

Dentro de las condiciones de estrés que tienen un efecto sobre la regulación genética y el metabolismo en bacterias patógenas y no patógenas, está la

limitación de oxígeno en el ambiente en el que crece. La determinación de la expresión del reportero se realizó en la cepa KSB837 crecida en LB (Luria Bertani) y anaerobiosis, por 10 horas (Figura 6A y B). El crecimiento en condiciones anaeróbicas fue menor, y no se encontró una activación del reportero en este medio, aún después de haber adicionado glucosa (Figura 6A y B). Esto significa que las condiciones anaeróbicas no son desencadenantes de la activación del sistema, aún cuando se mejoran las condiciones nutricionales para el crecimiento del cultivo.

7.4.- Activación en diferentes medios de cultivo.

Para mejorar las condiciones de crecimiento, se adicionó glucosa al medio y se crecieron los cultivos en Konberg, para evitar la acidificación por el metabolismo de la glucosa, ya que se encuentra adicionado con fosfatos que amortiguan el pH. Las diferencias de composición de los medios de cultivo podrían estar influyendo en la activación del sistema. En estas condiciones, la expresión del reportero se siguió hasta por 10 horas. Se determinó un mayor crecimiento en condiciones anaeróbicas y una activación del reportero menor al 50% de lo registrado en condiciones aeróbicas. (Figura 6C y D). Los resultados indican que la presencia o ausencia del oxígeno en el medio no influye en la expresión del reportero. Sin embargo, la composición del medio parece tener un efecto en la expresión de la fusión *csrB-lacZ*.

En medio Konberg se encontró una mayor actividad que en LB, lo que indica que bajo crecimiento en Konberg se mejora la expresión del reportero, por la presencia de las sales de fosfato que amortiguan los cambios de pH inducidos por el metabolismo. Este resultado podrá estar reflejando un posible papel del pH en la activación.

7.5.- Activación en diferentes pH's.

Para probar el papel del pH como una condición fisiológica importante en la activación del sistema BarA/UvrY y expresión de los genes regulados por éste,

se probaron medios amortiguados a diferentes pH's. Como medio de cultivo base se usó LB el cual se amortiguó a pH 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0.

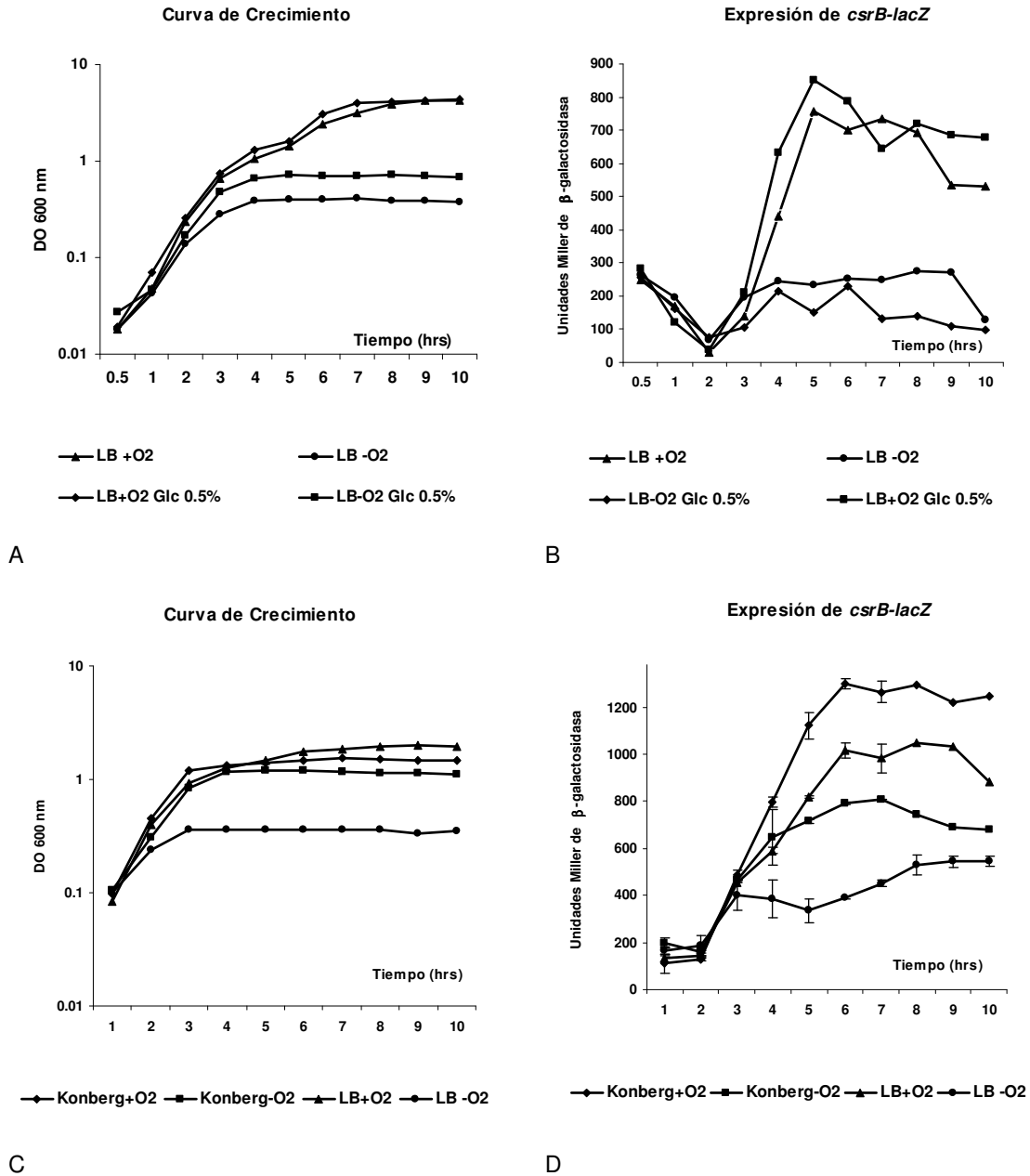


Figura 6. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la activación de BarA/UvrY y expresión de *csrB-lacZ*. A partir de un cultivo de toda la noche, se inició un cultivo con una DO_{600 nm} inicial de 0.1 en LB, LB-glucosa 0.05%, Konberg en aerobiosis y en anaerobiosis. Se registró el crecimiento por espacio de 10 hrs (A, C) y se determinó la actividad de β -galactosidasa cada 60 min, en cada caso (B, D). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

Respectivamente, para cada pH se usaron los siguientes amortiguadores: Homopipes, MES, MOPS y TAPS. Inicialmente se determinó el efecto del pH sobre la expresión de *csrB*. Los datos experimentales mostraron un papel fisiológico importante del pH en la regulación de la activación del sistema, ya

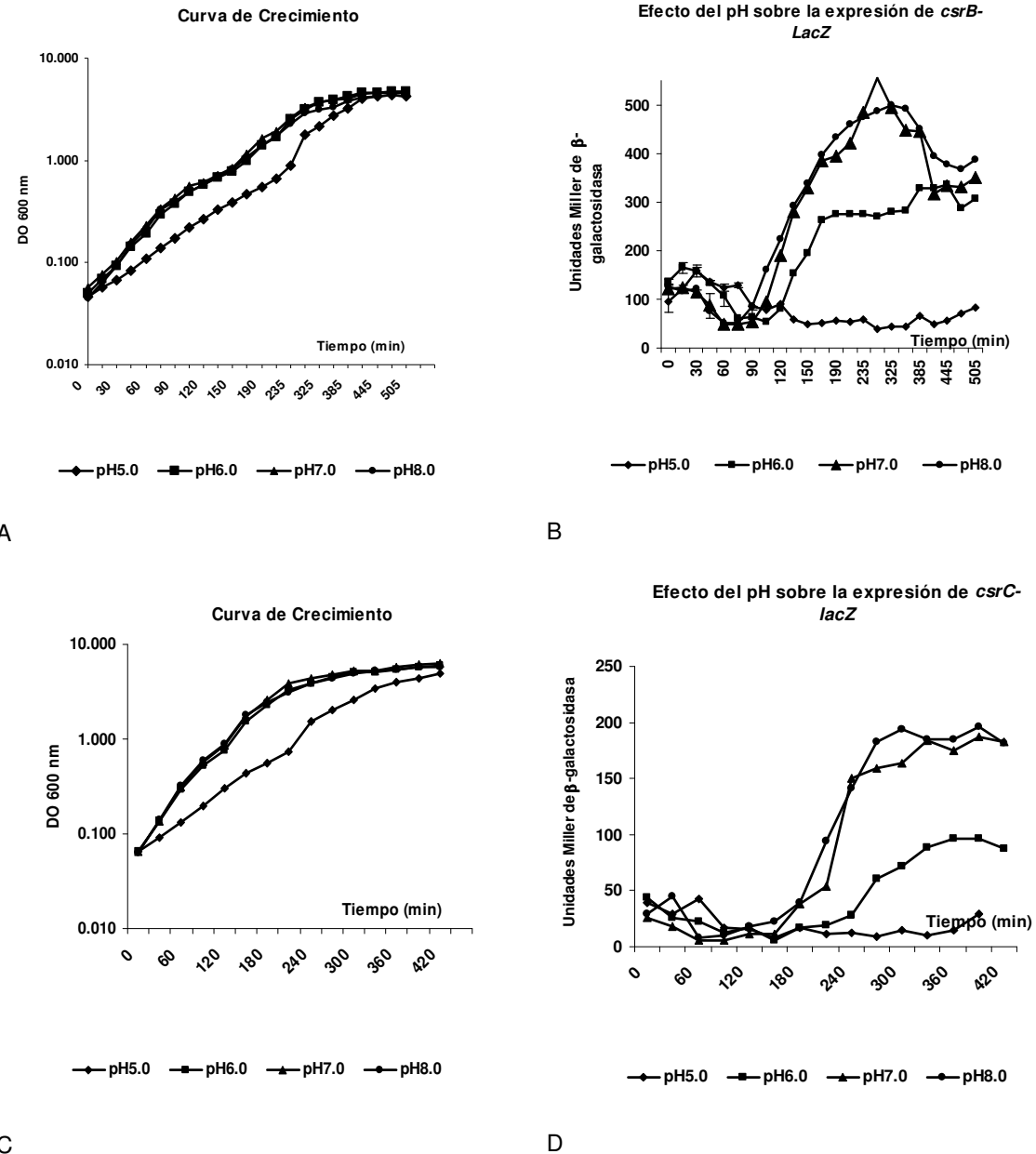


Figura. 7. Efecto del pH sobre la activación del sistema BarA/UvrY y expresión de la fusión *csrB-lacZ* (A,B) y *csrC-lacZ* (C, D) . Se partió de un precultivo con LB-Homopipes pH 5.0 crecido hasta una DO_{600nm} de 0.5. El cultivo se diluyó a una DO_{600nm} de 0.05 en LB-Homopipes pH 5.0, LB-MES pH 6.0, LB-MOPS pH 7.0 y LB-TAPS pH 8.0. Se determinó el crecimiento (A), la actividad de β-galactosidasa y pH cada 30 min por espacio de 8 horas. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

que a pH de 5.0, no se registró activación del sistema, por lo que se probó el efecto del mismo en la expresión de *csrC*. La expresión de los genes regulados por el sistema se determinó cada 15 y 30 min por espacio de 8 horas. El crecimiento es comparable en presencia de las diferentes sales amortiguadores utilizados. Sin embargo, se determinó una disminución moderada de la tasa de crecimiento en los cultivos a pH 5.0 (Figura 7).

Por otra parte, se observó una diferencia en los niveles de expresión entre *csrB* y *csrC*, lo que coincide con lo ya reportado (Welbacher *et al.*, 2003). La activación del reportero *csrB* fue mayor que la de *csrC*, lo que podría sugerir que su nivel de activación por UvrY es menor que la de *csrB* (Weilbacher *et al.*, 2003). No se encontró activación a pH 5 de los dos reporteros utilizados. La activación registrada en a pH 6 fue menor que en pH7 y 8 con ambos reporteros utilizados. La activación de los reporteros a pH 7 y 8 fue semejante en los dos casos. Igualmente, el pH del medio podría afectar las características fisicoquímicas de la señal, ya que a pH 7.0 la expresión de *csrB* y *csC* es aproximadamente dos veces mayor que a pH 6. Los resultados indicaron un posible efecto fisiológico del pH en la expresión de los reporteros y en su nivel de expresión, mostrando que los niveles de activación de la expresión del reportero dependen del valor de pH al que se enfrenta. En ambos casos el nivel de activación aumenta a medida que el cultivo alcanza la fase logarítmica.

Bajo estas condiciones no se encontró diferencia entre los niveles de activación a pH 7 y pH 8 en los dos reporteros utilizados. Además no hubo diferencias notables en los niveles de crecimiento para el intervalo de pH 6 a 8.

Los cambios de pH ejercidos por el metabolismo celular fueron registrados en cada muestra. Después de 8 horas de crecimiento, el pH final al utilizar Homopipes fue de 5.3, 6.4 para MES 7.5 para MOPS y 8.5 para TAPS. Estos resultados sugieren la posibilidad de activación del sistema en un punto determinado de pH, por lo que se diseñó un experimento que permitiera el cambio paulatino del pH (producido por el propio metabolismo), partiendo de condiciones ácidas (Figura 8). Para ello, se determinó la expresión del

reportero en medio LB-HCl pH 5.0 y se compararon con la expresión en un medio amortiguado con Homopipes a pH 5.0.

Se observó que la expresión del reportero se activa a pH 5.4 al utilizar LB-HCl y no se activa cuando las condiciones de pH permanecen constantes de acuerdo a estas condiciones. El pH registrado al final del experimento fue de 8.8 y 5.3 para LB-HCL y Homopipes respectivamente (Figura 8). En presencia de LB-HCl, el pH incrementa por arriba del pH fisiológico, resultado de la degradación de los aminoácidos del medio.

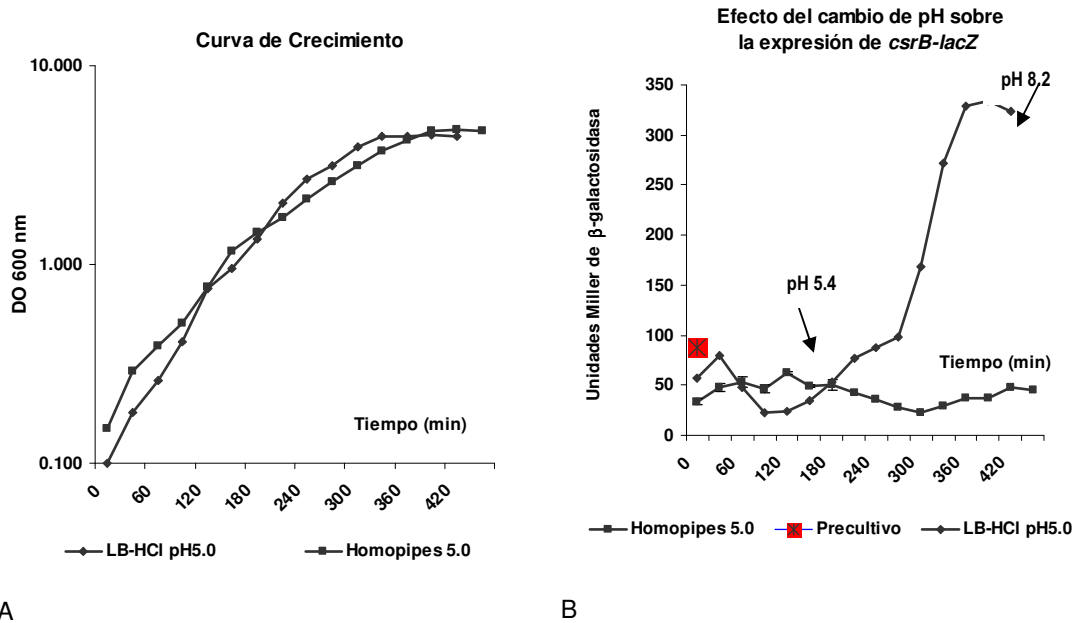


Figura. 8. Efecto del pH externo sobre la activación del sistema BarA/UvrY y expresión de *csrB-lacZ*. La cepa KSB837 se creció en LB-HOMOPIPES (■) y LB-HCl pH 5.0 (◆). El crecimiento se registró cada 30 minutos (A) y la actividad β -galactosidasa y pH se registraron en cada caso (B). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

Es posible que el pH desempeñe un papel fisiológico promoviendo las condiciones necesarias para la generación de la señal, o la estabilidad de la misma. De manera paralela es posible que la inactivación del sistema en condiciones ácidas sea el resultado de la sensibilidad del ensayo de β -galactosida, la inactivación de los SDC o la ausencia de las proteínas BarA y UvrY. Se determinó el efecto de cada una de estas alternativas utilizando el

sistema ArcA/ArcB, y buscando la constitutividad de BarA/UvrY bajo estas condiciones.

7.6.- Efecto del pH sobre ArcA/ArcB.

Anteriormente se describió la regulación de la expresión de los genes *lldp* y *cyd* bajo el control de la actividad del sistema ArcA/ArcB. El sistema ArcA/ArcB se activa en condiciones de microaerofilia permitiendo la expresión del gen *cyd*. (Cotter *et al.*, 1997). En aerobiosis, la inactivación del sistema desreprime la expresión del gen *lldp* (Fu *et al.*, 1991). En el laboratorio se cuenta con las cepas ECL 5002 y ECL 5003, así como las construcciones de *cyd-lacZ* y *lldp-lacZ* respectivamente. Ambas cepas se utilizaron para determinar la sensibilidad del ensayo de β -galactosidasa y de un SDC diferente al pH 5.0. La expresión de las fusiones *lldp-lacZ* y *cyd-lacZ*, se probaron en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente (Figura 9).

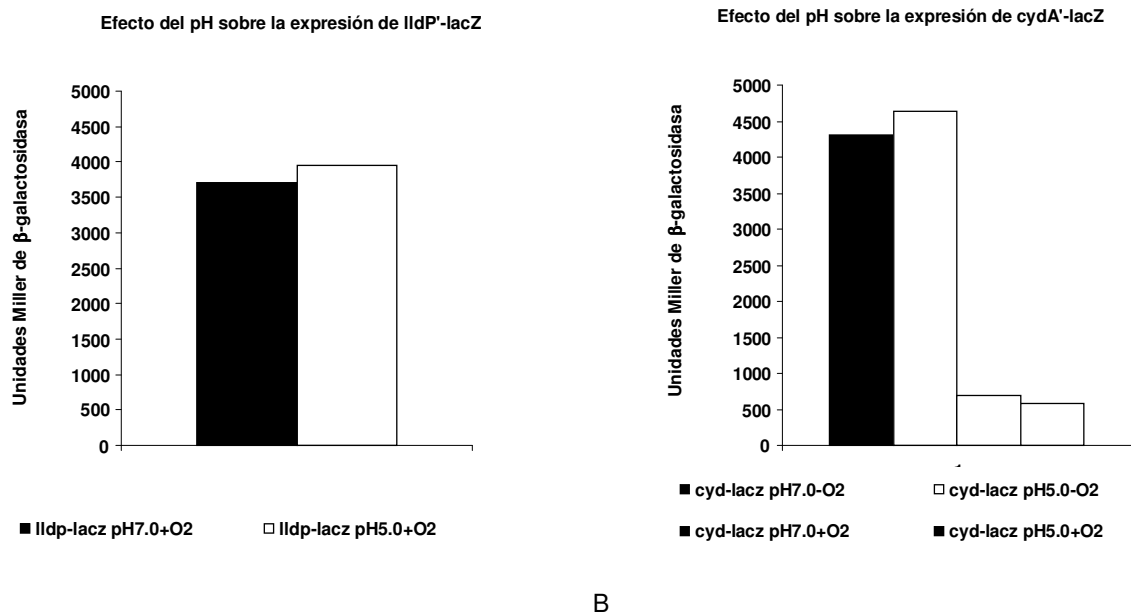


Figura 9. Efecto del pH sobre la expresión de las fusiones *lldp-lacZ* y *cyd-lacZ*. A partir de un cultivo de toda la noche de las cepas ECL 5003 (A) y ECL 5002 (B). Las cepas se crecieron en LB adicionado con 0.1 M MOPS (pH 7.0) y LB-Homopipes (pH 5.0) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se determinó la actividad de β -galactosidasa después de 60 min de crecimiento. La expresión de la fusión *lldp-lacZ* y *cyd-lacZ* se determinó para cada una de las cepas tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

No se encontraron diferencias en el nivel de expresión de la fusión *lldp-lacZ* en condiciones aeróbicas a pH 5.0 y 7.0, lo que indica que el ensayo de β -galactosidasa no se ve afectado por el pH del medio (Figura 9 A). De la misma manera, no se observaron diferencias en la activación del sistema ArcA/ArcB en ambos pH, por lo que los niveles de expresión del reportero *cyd-lacZ* bajo estas condiciones fue muy semejante (Figura 9B). Estos resultados permiten concluir que a pH 5.0, la fosforilación de los SDC, no se ve afectada, y que la activación del sistema se lleva a cabo permitiendo la expresión de los genes regulados positivamente.

7.7.- Efecto del pH sobre la presencia de BarA/UvrY.

Para determinar la presencia de BarA y UvrY en condiciones ácidas, se construyeron fusiones transcripcionales de *barA* y *uvrY* con *lacZ* y traduccionales de *uvrY*. Las cepas resultantes IFC601 (*barA-lacZ*), IFC602(*uvrY-lacZ*), e IFC603 (*uvrY-lacZ*), se crecieron en LB-Homopipes (pH 5.0) y LB-MOPS (pH 7.0). La expresión del reportero se determinó en ambos casos a una DO_{600nm} de 1.0 y 2.0. La figura 10 muestra que la expresión transcripcional de *barA-lacZ* y *uvrY-lacZ*, no se ve afectada por su crecimiento en condiciones ácidas.

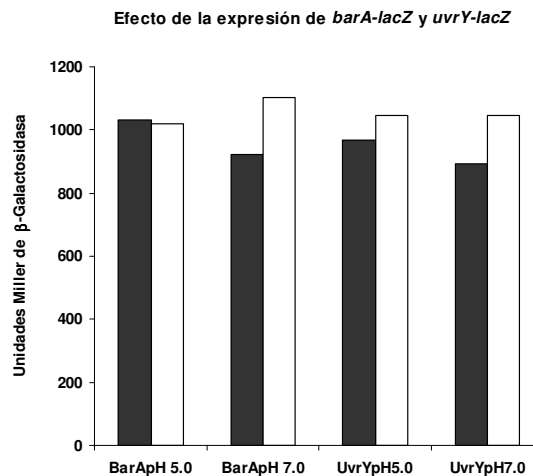


Figura 10.- Efecto del pH sobre la expresión de las fusiones transcripcionales *barA-lacZ* y *uvrY-lacZ*. Las muestras se tomaron a una absorbancia de 1.0 (■) y 2.0 (□), y se determinó la actividad de β -galactosidasa. Las cepas se crecieron en condiciones aeróbicas en LB-MOPS pH 7.0 y LB-Homopipes pH 5.0. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

La Figura 11 muestra la activación de la expresión de la fusión traduccional *uvrY-lacZ*. La activación no se ve afectada por las condiciones de pH. Lo cual indica que en condiciones ácidas, se expresa UvrY.

A partir de los anticuerpos contra BarA y UvrY, se determinó la presencia de las proteínas en condiciones de pH 5.0 y 7.0. En la Figura 12, se observa la presencia de BarA en ambas condiciones, por lo que se puede concluir que su presencia no se ve afectada por el pH. Nuestros resultados demuestran que tanto BarA como UvrY, no se ven afectadas por las condiciones de acidez en presencia de LB-Homopipes, por lo que la ausencia de expresión de la fusión *csrB-lacZ*, es el resultado de la inactivación del sistema, y de fosforilación de ambos componentes.

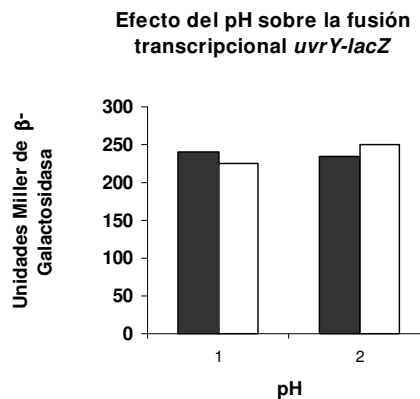


Figura 11.- Efecto del pH sobre la expresión de la fusión traduccional *uvrY-lacZ*. Las muestras se tomaron a una absorbancia de 1.0 (■) y 2.0 (□) y se determinó la actividad de β-galactosidasa para pH 5 (1) y pH 7.0 (2). Las cepas se crecieron en condiciones aeróbicas en LB-MOPS pH 7.0 y LB-Homopipes pH 5.0. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

7.8.- Efecto de la glucosa sobre la actividad.

Los resultados obtenidos en la figura 8, mostraron que en LB-HCl, las células incrementan su pH como producto del metabolismo, a niveles superiores del pH fisiológico. La degradación de peptonas del medio permite la alcalinización del mismo a través de la liberación de aminas. Pensamos que bajo estas mismas condiciones, al adicionar glucosa en LB-HCl y LB-Homopipes, la

presencia de glucosa contrarrestaría el efecto alcalinizante a través de la producción de ácidos mixtos en la glucólisis y de esta forma inhibiría el sistema resultando en la no activación de la transcripción de la fusión de *csrB-lacZ*.

Los resultados de la figura 13, muestran que en condiciones ácidas y en presencia de glucosa, el sistema se activa. El pH se registró cada 30 min, y se muestran el pH inicial y final de cada experimento en la tabla 4. En el medio LB-HCl adicionado con glucosa, no se registró cambio en el pH, hasta el final del experimento, indicando que el metabolismo de la glucosa produjo una combinación de ácidos mixtos que mantuvieron el pH en condiciones ácidas. Los datos obtenidos permiten excluir al pH como la señal de activación, y sugerir la presencia de metabolitos de la glucosa o a la glucosa misma con un papel regulatorio de la actividad. Es posible que la glucosa o alguno de sus metabolitos provean las condiciones necesarias para iniciar la activación del sistema independientemente del pH.

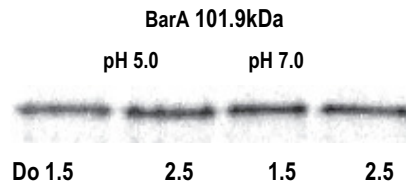


Figura. 12 Determinación de BarA y UvrY por Western blot. La cepa KSB837, se creció hasta una DO_{600nm} de 1.5, se cosecharon y se solubilizaron a 95°C por 5 min en un amortiguador reductor para SDS-PAGE. Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida al 10%, y se electrotrasfirieron a papel de nitrocelulosa Hybond-ECL. La proteína BarA se identificó con anticuerpos específicos anti BarA de acuerdo a lo descrito (Tomenius *et al.*, 2005).

	LB- Homopipes	LB- Homopipes- glucosa	LB-HCl	LB-HCl-glucosa
pH inicial	4.9	4.9	4.9	4.90
pH final	5.2	4.9	8.1	4.9

Tabla 4. Cambios de pH en cultivos con glucosa. El pH inicial y final se registró para cada caso.

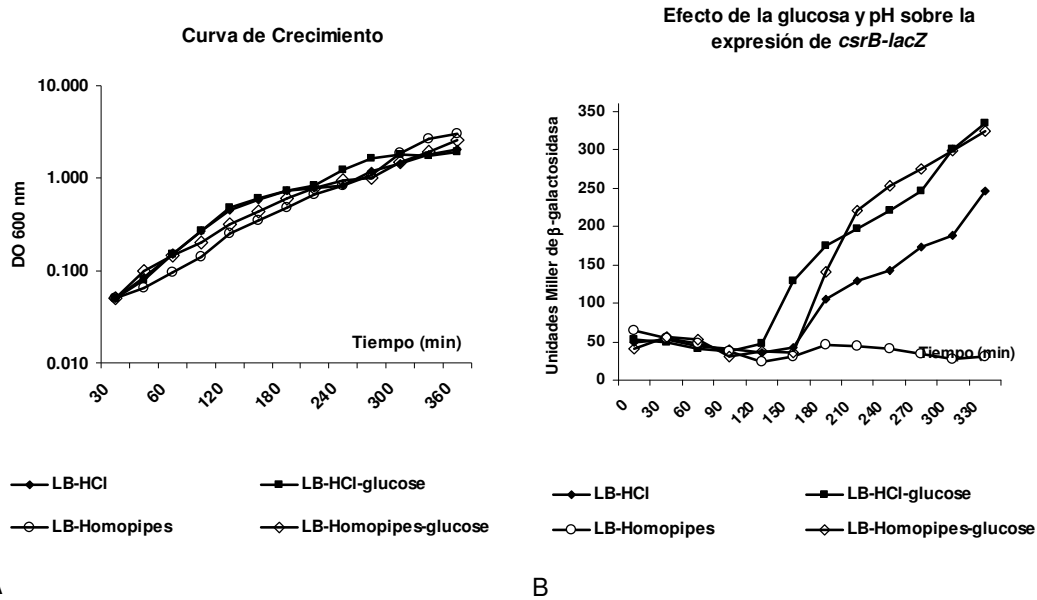


Figura 13. Efecto de la glucosa en condiciones de acidez, sobre la activación del sistema y expresión de la fusión *csrB-lacZ*. La cepa KSB837 se creció en LB-HOMOPIPES y posteriormente se transfirió a LB-HCl pH 5.0, y LB-Homopipes, ambos en presencia de glucosa 0.2% y en ausencia de la misma. El crecimiento se registró cada 30 minutos (A) y la actividad β -galactosidasa y pH se registraron en cada caso (B). Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose siempre el mismo comportamiento. Se muestran los resultados de uno de ellos.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

Para sobrevivir en la naturaleza bajo una serie de condiciones ambientales cambiantes, los microorganismos deben ser capaces de adecuarse rápidamente a las condiciones que encuentran en los numerosos nichos a los que se enfrentan, tales como cambio de pH, disponibilidad de nutrientes, osmolaridad, estrés oxidativo, temperatura, etc. *E. coli* posee una gran variedad de mecanismos que le permiten hacer frente a los cambios ambientales, ejemplo de ello son las respuestas mediadas por los SDC.

Los SDC son circuitos moleculares que sensan y procesan las señales ambientales, para finalmente responder de una forma específica y adaptarse a los diferentes ambientes. Dentro de la amplia gama de SDC que posee *E. coli*, el sistema BarA/UvrY se encuentra relacionado con ambientes estresantes, ya que como se ha determinado en este trabajo, el sistema estudiado se inactiva a pH ácido. Estudios bioquímicos y genéticos han mostrado que el SDC BarA/UvrY controla el sistema Csr y eventos de patogenicidad (Suzuki *et al.*, 2002, Weilbacher *et al.*, 2003, Herren *et al.*, 2006; Tomenius *et al.*, 2006).

Anteriormente se demostró que en *Pseudomonas*, el SDC GacA/GacS funciona de manera paralela al sistema QS (Kay *et al.*, 2006). Al inicio de esta investigación, se pensó que su ortólogo en *E. coli* podría activarse de manera semejante, dependiente de la densidad poblacional. Por mucho tiempo, el sistema QS en *E. coli* y *Salmonella* ha sido controversial. Sin embargo, se ha demostrado que estos dos microorganismos usan varios sistemas QS, tal como LuxS/AI-2, AI-3/epinefrina/norepinefrina, indol y el homólogo de LuxR, SdiA, en el señalamiento intercelular, lo que conlleva a la adecuación al ambiente (Walters and Sperandio., 2006). El ambiente gastrointestinal se encuentra poblado por un gran número y diversidad de microorganismos, los cuales se comunican entre sí y muy probablemente con el huésped, regulando de esta manera la expresión de mecanismos de virulencia (Kievit and Iglewski., 2000).

La comunicación entre este tipo de comunidades permite la activación de SDC. Es posible que en *E. coli* la activación de SDC se encuentre regulada por sistemas QS, y entre ellos la activación de BarA/UvrY podría responder de manera paralela al sistema QS, por lo que la densidad poblacional sería un factor desencadenante de la activación del mismo. Con el fin de encontrar alguna relación entre la densidad poblacional y la activación del sistema BarA/UvrY, se determinó el efecto de la densidad poblacional creciente y el nivel de activación del sistema. El presente estudio mostró que la activación del sistema BarA/UvrY no está en función de la densidad poblacional (Figura 5). Se determinó que el sistema se activa en la parte media de la fase exponencial de manera independiente a densidad poblacional inicial. Es posible que la activación del sistema se deba al incremento de algún metabolito producido por la población, como ya ha sido sugerido con anterioridad en *Salmonella* (Lawhon *et al.*, 2002), y *Pseudomonas fluorescens* (Heeb *et al.*, 2002; Zuber *et al.*, 2003).

Los ensayos no mostraron activación del sistema dependiente de microaerofilia. Bajo estas condiciones, el cultivo mostró limitaciones en su crecimiento. Sin embargo, en presencia de Konberg y glucosa se determinó activación del sistema. Es posible que la diferencia registrada entre ambas condiciones de cultivo sea resultado de la presencia de fosfatos en el medio de Konberg, los que amortiguan el pH permitiendo un incremento en el crecimiento y activación del sistema, evitando de esta forma la caída de pH por los productos metabólicos de la fermentación de la glucosa.

La activación del sistema por la presencia de fosfatos en estas condiciones, indica un posible papel del pH en la activación, por lo que se pensó en probar el efecto de diferentes valores de pH en la activación. Igualmente, el papel de la glucosa en la activación del sistema ha sido probado en el laboratorio, y los resultados han mostrado un efecto de ésta. Cabe mencionar que en presencia de LB-Homopipes-glucosa, la activación del sistema se registró aún en condiciones de acidez y tras 180 min de cultivo. El tiempo requerido para la activación bajo estas condiciones podría sugerir la producción y/o acumulación de algún metabolito producto de la degradación de la glucosa. Pensamos que

la experimentación en presencia de metabolitos de la glucosa como piruvato, lactato, acetato, etanol, y formiato entre otros podrían indicar el papel del metabolismo de la glucosa en la activación del sistema. Actualmente, en el laboratorio, se están probando estas condiciones, y resultados preliminares muestran al acetato, formiato y propionato como algunos de los metabolitos que permiten la activación del sistema en condiciones ácidas, lo que descarta al pH por sí mismo como señal de activación (Fig 13, Tabla 2). Sin embargo, es necesario estudiar más a fondo el papel de cada uno de los metabolitos en la activación, esto permitirá conocer los factores bioquímicos necesarios para la generación de la señal.

La activación del sistema BarA/SirA, en presencia de ácidos grasos de cadena corta, ha sido determinada por Lawhon *et al.*, 2002. En este estudio, se mostró que en pHs medianamente ácidos en presencia de acetato y ácidos grasos de cadena corta, se generan las condiciones necesarias para la expresión de *hilA*, el cual se encuentra regulado por SirA. De esta manera, se desencadena la expresión de genes de virulencia en *Salmonella typhimurium*. Igualmente, se ha implicado al acetil-P como activador directo de SirA, y se ha sugerido al acetato como fuente principal para la formación de esta molécula (Lawhon *et al.*, 2002), que activaría directamente a UvrY.

Como ya se mencionó, los ortólogos de BarA/UvrY en otras bacterias gram negativas tales como GacS/GacA en *Pseudomonas*, ExpS/ExpA en *Erwinia* spp; y BarA/SirA en *Salmonella* spp, se encuentran relacionados con la expresión de mecanismos de virulencia (Tabla 2). Tanto *E. coli* como *Salmonella* residen en el tracto gastrointestinal, donde enfrentan un gradiente de pH que cambia incrementando desde el estómago hasta el colon. Las bacterias enfrentan la acidez estomacal antes de alcanzar su destino final en el intestino. La habilidad de *E. coli* O157:H7 de resistir las condiciones ácidas que enfrenta en el estómago, le permite finalmente llegar a su destino (Lin *et al.*, 1996). Recientemente se ha sugerido la importancia del pH en la activación de la expresión de los genes de virulencia (Lawhon *et al.*, 2002) en *Salmonella* a través del sistema BarA/SirA. La activación de SirA modula la expresión de *hilA* (Teplitski *et al.*, 2003), y consecuentemente la expresión de genes de virulencia

en *Salmonella*. La presente investigación mostró una clara dependencia del pH sobre la activación del BarA/UvrY. La inactivación del sistema por este mecanismo parece ser específica de BarA/UvrY, ya que los resultados obtenidos para la activación del sistema ArcA/ArcB, muestran su funcionalidad en condiciones de acidez. La presencia de BarA/UvrY en condiciones ácidas, sugiere que la inactivación del sistema es el resultado de la inactivación de la señal, o la no producción de la misma por la ausencia de condiciones fisiológicas necesarias. Sin embargo los datos experimentales muestran que los cambios en pH proveen las condiciones fisiológicas para el desarrollo de la activación o producción de la señal.

A pesar de que se desconoce la señal de activación del sistema, es posible que ésta sea producida por el propio organismo, ya que en *Pseudomonas fluorescens* (Heeb *et al.*, 2002; Zuber *et al.*, 2003) se ha descrito una señal extracelular capaz de activar el sistema GacS/GacA en la fase estacionaria. Estos resultados sugieren que la señal de activación podría ser un producto extracelular que tras su acumulación, es capaz de activar el sistema.

Por otra parte, los resultados preliminares sobre el metabolismo de la glucosa sugieren el papel de la degradación de esta molécula en la activación. Sistemas ortólogos de BarA/UvrY podrían responder de manera semejante, lo que propondría que en condiciones de acidez se inhibiría su síntesis o se inactivaría. Sin embargo, el papel del dominio periplásmico en la recepción de la señal, aún no ha sido aclarado, lo que permitiría hipotetizar dos tipos de señales, de acuerdo a las diferencias encontradas en este dominio.

La activación del sistema en presencia de glucosa implicaría de acuerdo a la literatura reportada, una inhibición en el metabolismo de acetato, concretamente el incremento de acetato e inihición de la donación de esta molécula a través del Acetil-CoA hacia el ciclo de Krebs, y del glioxalato (Wei *et al.*, 2000). Se ha determinado que en presencia de glucosa, se activa la glucólisis y se reprimen algunos pasos del ciclo TCA, favoreciéndose la producción de succinato y 2-cetoglutarato, lactato, fumarato, etanol y acetato (Wolfe, AJ. 2005). Igualmente, se favorece la producción de acetil-P. De

acuerdo a lo reportado, la vía gluconeogénica se activaría, la cual a su vez permitiría la formación de biopelículas (Jackson *et al.*, 2002, Romeo *et al.*, 1993, Sabnis *et al.*, 2003). Como ya se mencionó, la expresión de *crB* y su incremento, secuestran a la proteína CsrA quien regula positivamente el metabolismo de acetato, biosíntesis de flagelo, movilidad y glucólisis (Jackson *et al.*, 2002, Romeo *et al.*, 1993, Sabnis *et al.*, 2003, Wei *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2001). CsrA regula negativamente la gluconeogénesis, glucogenogénesis y formación de biopelículas (Jackson *et al.*, 2002, Romeo *et al.*, 1993, Sabnis *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 1996). Con base a estas implicaciones, se podría hipotetizar que:

- Metabolitos producidos por la degradación de la glucosa podrían estar involucrados en la activación del sistema.
- Un posible papel del acetyl-P en la activación.
- La biosíntesis del flagelo se vería inhibida para estimular la formación de biopelículas, lo que permitiría el establecimiento y colonización del microorganismo en un sitio determinado.

Mutantes en las enzimas involucradas en la formación de acetyl-P (AckA-Pta), permitirán esclarecer su papel en activación. De la misma manera, sería importante aclarar el papel de los metabolitos productos de la fermentación de la glucosa, en la activación.

Recientemente se ha demostrado el papel de BarA/UvrY en virulencia (Tomenius *et al.*, 2006. Herren *et al.*, 2006) y es posible que en ambientes ácidos como podría ser el ambiente estomacal, el sistema BarA/UvrY se inactiva en representantes patógenos de *E. coli*. Condiciones cercanas a la neutralidad permitirían la activación del sistema, y la expresión de genes de virulencia dependientes del sistema BarA/UvrY de manera semejante a lo reportado en *Salmonella*. Por otra parte nuestros resultados sugieren que independientemente de los valores de pH registrados in situ, los metabolitos de glucosa podrían activar a BarA/UvrY. Se desconoce si existe una regulación directa de la expresión de genes de virulencia en *E. coli* por el sistema BarA/UvrY, sin embargo, se ha mostrado que mutantes en BarA y UvrY

muestran fenotipos con menor virulencia (Herren *et al.*, 2006, Tomenius *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 9
CONCLUSIONES

1. El sistema BarA/UvrY no se activa por la densidad poblacional.
2. El sistema BarA/UvrY no se activa en un pH ácido.
3. El incremento de pH permite la activación del sistema BarA/UvrY.
4. En condiciones de acidez, es posible activar el sistema en presencia de glucosa.
5. El pH no es la señal de activación.

CAPÍTULO 10

PERSPECTIVAS

La identificación de la señal, es uno de los aspectos más importantes a conocer dentro del sistema BarA/UvrY. Actualmente, en el laboratorio se estudia el papel de sustratos glicolíticos en la activación del sistema en condiciones ácidas. Estudios genéticos al respecto permitirán concluir el papel definitivo de cada uno de los metabolitos en la señalización.

Otro de los aspectos interesantes a estudiar en este sistema, es el referente a la función de la CS. En la gran mayoría de los SDC, se desconoce la señal de activación, pero en algunos, se ha mostrado que la región periplásmica de la CS está involucrada en la recepción de la misma (Regelmann *et al.*, 2002). Sin embargo, cabe mencionar que BarA posee un dominio PAS. Se desconoce la importancia fisiológica del mismo y su posible papel en la recepción de la señal. La participación de estos dos dominios en la funcionalidad de la proteína y la recepción de la señal son aspectos que aún no han sido evaluados y su estudio genético permitirá conocer su participación en la recepción de la señal y en la funcionalidad de la estructura de la proteína.

El estudio de la CS BarA y sus ortólogos ha permitido diferenciar la región periplásmica en dos grupos; un grupo contiene una región periplásmica homóloga a la de la CS GacS y el otro a la de BarA. Si la región periplásmica funciona como receptora de la señal en este sistema, es posible que las diferencias entre ambas regiones impliquen la existencia de señales distintas para cada grupo. La construcción de quimeras GacS-BarA, permitirá discernir el papel funcional de la región periplásmica en la activación de la CS.

La búsqueda de otros genes regulados por el sistema BarA/UvrY, permitirá una mejor comprensión de su papel en el metabolismo y fisiología. En otros ortólogos del sistema BarA/UvrY, se ha descrito su funcionalidad en la manifestación de mecanismos de virulencia y en la expresión de genes

involucrados en la misma. En *E. coli*, el papel de BarA/UvrY en virulencia se ha descrito únicamente a nivel fenotípico en mutantes UvrY. Sin embargo, la identificación de genes de virulencia regulados por este sistema, se hace necesario para establecer una función biológica conservada entre las diferentes γ -proteobacterias. Actualmente se puede concluir que en las especies que presentan el SDC BarA/UvrY y sus ortólogos, este sistema presenta tres funciones identificadas: su regulación en el metabolismo del carbono, a través del sistema Csr en *E. coli*, metabolismo secundario y su papel en el control de la expresión de los mecanismos de virulencia.

REFERENCIAS

1. Ahmer, BM., J. van Reeuwijk, PR. Watson, TS. Wallis, F. Heffron. 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol.* 31(3):971-82.
2. Altier, C., M. Suyemoto, AI. Ruiz, KD. Burnham, and R. Maurer. 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol. Microbiol.* 35:635-646.
3. Anand, SK., MW. Griffiths. 2003. QS and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* Aug 15;85(1-2):1-9.
4. Appleman, JA., and V. Stewart. 2003. Mutational analysis of a conserved signal-transducing element: the HAMP linker of the *Escherichia coli* nitrate sensor NarX. *J. Bacteriol.* 185:89-97.
5. Aravind, L., CP. Ponting. 1999. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signaling proteins. *FEMS Microbiol Lett* 176:111-116.
6. Baker, CS., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo, and P. Babitzke. 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*
7. Barak, R., and M. Eisenbach. 1992. Correlation between phosphorylation of the chemotaxis protein CheY and its activity at the flagellar motor. *Biochemistry* 31:1821-1826.
8. Barret, JF., and JA. Hoch. 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998 Jul;42(7):1529-36
9. Barta, TM., TG Kinscherf, and DK Willis. 1992. Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* 174:3012-3029.
10. Barta, TM., TG. Kinscherf, TF. Uchytíl, and DK. Willis. 1993. DNA sequence and transcriptional analysis of the *tbIA* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:458-466.

11. Bassler, BL. 1999. How bacterial talk to each other: Regulation of gene expression by QS. *Curr. Opin. Microbio.* 2:582-587.
12. Blumer, C., G. Pessi, D. Haas. 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprortase production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23;96(24):14073-8.
13. Burbulys, D., KA. Trach, JA. Hoch. 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 8;64(3):545-52.
14. Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno, and G. Espin. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii* *J. Bacteriol.* 182: 2426-2628.
15. Castañeda, M, J. Sanchez, S. Moreno, C. Nuñez, G. Espin. 2001. The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* 183(23):6787-6793.
16. Chancey, ST., Wood, D.W., and Pierson, L.S., III. 1999. Two component transcriptional regulation of N-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aerofaciens*. *Appl. Environ. Microbio.* 65:2294-299.
17. Chatterjee, A., Cui Y. and Chatterjee A.K. 2002. Regulation of *Erwinia carotovora* hrpL(Ecc) (sigma-L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon . *Mol Plant-Microbe Interact.* 15:971-980.
18. Cotter, PA., SB. Melville, JA Albrecht, RP. Gunsalus. 1997. Aerobic regulation of cytochrome *d* oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Mol Microbiol.* 25:605–615.
19. Cui, Y., Mukherjee A, Dumenyo CK, Liu Y, Chatterjee AK. 1999. rsmC of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and harpin(Ecc) production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (rsmB) and RNA-binding protein (RsmA). *J Bacteriol.* 181(19):6042-52.

20. Cui, Y., Chatterjee A, Chatterjee AK. 2001. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. *Mol Plant Microbe Interact.* 14(4):516-26.
21. Dailey, FE. And HC. Berg. 1993. Change in direction of flagellar rotation in *Escherichia coli* mediated by acetate kinase. *J Bacteriol.*175:3236-3239.
22. Danese PN., WB. Snyder, CL. Cosma, LJ. Davis, TJ. Silhavy. 1995. The Cpx two-component signal transduction of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease. DegP. *Genes Dev.* 9:387-398.
23. Davey ME., and. O'toole GA.. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(4):847-867.
24. Deretic, V., JH. Leveau, CD. Mohr, NS. Hibler. *In vitro* phosphorylation of AlgR, a regulator of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, by a histidine protein kinase and effects of samII phospho-donor molecules. *Mol Microbiol.* 6: 2657-2761.
25. Donnenberg, MS., and JB Kaper. 1991. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59:4310-4317.
26. Ducky, B.K., and G. Défago,. 2000. Controlling instability in gacS-gacA regulatory genes during inoculan production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.*66:3142-3150.
27. Dubey, AK., Baker, C.S., Suzuki, K., Jones, A.D., Pandit, P., Romeo, T., and Babitzke, P. 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol.* 185: 4450–4460.
28. Dubey, AK., CS. Baker, T Romeo, P. Babitzke. 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA.* Oct;11(10):1579-87.
29. Ellermeier, CD., JR. Ellermeier, JM. Slauch. 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type

- three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*; 57(3):691-705.
30. El-Sayed, AK., J. Hothersall, CM. Thomas. 2001 Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antibiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology*. 147(Pt 8):2127-39.
31. Eriksson, AR., RA. Anderson., M. Pirhonem., and ET. Palva. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 11:743-752.
32. Fettes, PS., Forsbach-Birk V, Lynch D, Marre R. 2001. Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int J Med Microbiol*. 291(5):353-60.
33. Fortune, DR., M. Suyemoto M, C. Altier. 2006. Identification of *CsrC* and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*.74(1):331-9.
34. Frederick, RD., J. Chiu, JL. Bennetzen., AK. Handa . 1997. Identification of a pathogenicity locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that encodes a two-component sensor-regulator protein. *Mol. Plant-Microbe Interact* 10: 407-415.
35. Fu, H-A, S. Iuchi, ECC.Lin. The requirement of *ArcA* and *Fnr* for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol Gen Genet*. 1991;226:209–213.
36. Georgellis, D., AS. Lynch, and ECC. Lin. 1997. In vitro phosphorylation study of the *Arc* two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 179:5429-5435.
37. Georgellis, D, O. Kwon O, EC. Lin. 2001. Quinones as the redox signal for the *arc* two-component system of bacteria. *Science*. Jun 22;292(5525):2314-6.
38. Gong, W., B. Hao, SS. Mansy, G. Gonzalez, MA. Gilles-Gonzalez, MK. Chan. 1998. Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A22;95(26):15177-15182.
39. Goodier, R.I., B.M. Ahmer. 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol.* 183:2249-2258.
 40. Goodman, A.L., B. Kulasekara, A. Rietsch, D. Boyd, R.S. Smith, S. Lory. 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell.* 7(5):745-54.
 41. Grebe, T.W., J.B. Stock. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.* 41:139-227.
 42. Gudapaty, S., K. Suzuki, X. Wang, P. Babitzke, and T. Romeo. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:6017-6027.
 43. Haas, D., C. Blumer, and C. Keel. 2000. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: Importance of positive feedback regulation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:290-297.
 44. Halatsi K, I. Oikonomou, M. Lambiri, G. Mandilara, A. Vatopoulos, A. Kyriacou. 2006. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the QS gene *sdhA*. *FEMS Microbiol Lett.* 259(2):201-207.
 45. Hanzelka B.L., and E.P. Greenberg. 1996. QS in *Vibrio fischeri*: evidence that adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* 178(17):5291-5294.
 46. Heeb, S., and D. Haas. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14(12):1351-1363.
 47. Heeb, S., C. Blumer, and D. Haas. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.
 48. Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):373-95.
 49. Herren, C.D., A. Mitra, S.K. Palaniyandi, A. Coleman, S. Elankumaran, S

- Mukhopadhyay. 2006. The BarA-UvrY two component system regulates virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* 078:K80:H9. *Infect. Immun.* 74(8):4900-4909.
50. Hirano, SS., and CD. Upper. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-A pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624-653.
51. Hbarak, EM., DK Willis. 1992. The *lemA*: gene requires for pathogenicity of *Pseudomonas syringiae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol.* 174:3011-3020.
52. Hoch, JA. 1993a. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Microbiol.* 47:441-465.
53. Hoch, JA. 1993b. The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J Cell Biochem.* 51(1):55-61.
54. Hoch, JA. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:165-170.
55. Holden, M., S. Swift, and P. Williams. 2000. New signal molecules on the quorum-sensing block. *Trends Microbiol.* 8:101-104.
56. Howell, CR., and RD. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology.* 69:480-482.
57. Howell, CR., and RD. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology.* 70:712-715.
58. Hyytiäinen, H., M. Montesano M, ET. Palva. 2001. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-rsmB system in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* 14(8):931-8.
59. Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, T. Mizuno. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13:5195-5202.
60. Iuchi, S., EC. Lin. 1988. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:1888-1892.

61. Jackson, DW., K. Suzuki, L. Oakford, JW. Simecka, ME. Hart, and T. Romeo. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184(1):290-301.
62. Johnston, C., DA. Pegues, CJ. Hueck, A. Lee, SI. Miller. 1996. Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. Mol. Microbiol. 22:715-727.
63. Jones, BD. 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. J Microbiol. 43 Spec No:110-117.
64. Jourlin, C., M, Ansaldi, V, Mejean. 1997. Transphosphorylation of the TorR response regulator requires the three phosphorylation sites of the TorS unorthodox sensor in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 11;267(4):770-7.
65. Kay E, B. Humair, V. Denervaud, K Riedel S Spahr, L Eberl, C Valverde, D Haas. 2006 .Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol.188(16):6026-33.
66. Kierek, K., and PI. Watnick. 2003. Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. Appl. Environ. Microbiol 69:5079-5088.
67. Kievit, TR., BH. Iglewski. 2000. Bacterial QS in pathogenic relationships. Infect Immun. Sep;68(9):4839-49. Review.
68. Kitten, T., TG. Kinscherf, JL. McEvoy, and DK. Willis. 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. Mol. Microbio. 28:917-929.
69. Kleerebezem, M., MM. Beerthuyzen, EE. Vaughan, WM. de Vos, OP. Kiupers. 1997. Controlled gene expression system for lactic acid bacteria: transferable nisin inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* ssp. Appl. Environ. Microbiol. 63:4581-4584.
70. Korchid, A., M. Ikura. 2006. Bacterial histidine kinase signal sensor and transducer. IJBCB. 38:307-312.
71. Kraus, J., and JE. Loper. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Phytopathology.82:264-271.

72. Kwon, O., D. Georgellis, AS, Lynch, D. Boyd, EC. Lin. 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region.
73. Lawhon, SD., R. Maurer, M. Suyemoto M, C. Altier. 2002 Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 46(5):1451-64).
74. Lazazzera, BA., and AD. Grossman. 1998. The ins and outs of peptide signalling. *Trends Microbiol.* 6:288-294.
75. Lehoux, IE, MJ Mazzulla, A Baker, CM Petit. 2003. Purification and characterization of YihA, an essential GTP-binding protein from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 30(2):203-9.
76. Lenz, DH., MB. Miller., J. Zhu., RV. Kulkarni., BL. Bassler. 2005. CsrA and the three redundant small RNAs regulate QS *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 58(4):1186-202
77. Liao, CH., DE. McCallus, JM. Wells, SS. Tzean, and GY. Kang,. 1996. The *rep* gene required for the production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas viridiflava* is an analog of the *gacA* gene of *Pseudomonas syringae*. *Can. J. Microbiol.* 42:177-182
78. Liao, CH., DE. McCallus, WF. Fett, and Y. Kang. 1997. Identification of gene loci controlling pectate lyase production and soft-rot pathogenicity in *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.* 43:425-431.
79. Liaw, SJ., Lai HC, Ho SW, Luh KT, Wang WB. 2003. Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *J Med Microbiol.* 52(Pt 1):19-28.
80. Lin, J., MP. Smith, KC. Chapin., HS. Baik, GN. Bennett, and JW. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3094-3100.
81. Lin, JJ., A. Sancar. 1992. Active site of (A)BC excinuclease. I. Evidence for 5' incision by UvrC through a catalytic site involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 residues. *J Biol Chem* 5;267(25):17688-17692.
82. Liu, Y., and T. Romeo. 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 179:4639-4642.

83. Liu, Y., G. Gui, B. Wei, JF. Preston III, L. Oakford, U. Yuksel, D. P. Giedroc, and T. Romeo. 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.
84. Liu, Y., Y. Cui, A. Mukherjee, AK. Chaterjee. 1998. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol Microbiol.*29(1):219-34.
85. Lukat, GS., WR. McCleary, AM. Stock, JB. Stock. 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:718-722.
86. Lynch, AS., ECC. Lin. 1996. 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.
87. Malpica, R., B. Franco, C. Rodríguez, O. Kwon and D. Georgellis. 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*101:13318-13323.
88. Malpica, R., G. Peña-Sandoval, C. Rodríguez, B. Franco, D. Georgellis. 2006. Signaling by the Arc two-component system provides a link between the reox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid. Redox. Signal.* 8:781-795.
89. Marits, R., M. Tshuikina, M. Pirhonen, E. Laasik. A. Mae. 2002. Regulation of the expression of prtW::gusA fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology.* 148(Pt 3):835-42.
90. Miller, JH. *Experiments in Molecular Genetics.*1972. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.352-355.
91. Mishra M., G. Parise, KJ. Jackson, DJ. Wozniak, R. Deora. 2005. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol.* 187(4):1474-1484.
92. Mondragon, V., B. Franco, K. Jonas, K. Suzuki, T. Romeo, O. Melefors, D. Georgellis. 2006 pH dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Sep 15; [Epub ahead

of print]

93. Moolenaar, GF., CA. van Sluis, C. Backendorf, P. van de Putte. 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(10):4273-4289.
94. Mukherjee, A., Y. Cui, W. Ma, Y. Liu, A. Ishihama, A. Eisenstark, AK. Chatterjee. 1998. RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol.* 180(14):3629-34.
95. Mukhopadhyay, S., JP. Audia., RN. Roy, and HE. Schelhorn. 2000. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two component regulator. *Mol. Microbiol.* 37:371-381.
96. Murata, H., T. Tsukamoto and A. Shirata. 1998. *rtpA*, a gene encoding a bacterial two component sensor kinase, determines pathogenic traits of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease of a cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience.* 39:261-271.
97. Nagasawa, S., S. Tokishita., H. Aiba, and T. Mizuno. 1992. A novel sensor regulator protein that belongs to the homologous family of signal transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6: 799-807.
98. Neiditch, MB., MJ. Federle, ST. Miller, BL. Bassler, FM. Hughson. 2005. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell.* 27;18(5):507-518.
99. Neiditch, MB., MJ. Federle, AJ. Pompeani, RC. Kelly, DL. Swem, PD. Jeffrey, BL. Bassler, FM .Hughson. 2006. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates QS. *Cell.* 22;126(6):1095-1108.
100. Novak-Thompson, B., SJ. Gould, J. Kraus, and E. Loper.1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Can J. Microbiol.* 40:1065-1066.
101. O'may, CY., DW. Reid, SM. Kirov. 2006. Anaerobic culture conditions favor biofilm-like phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from

- patients with cystic fibrosis. FEMS Immunol Med Microbiol. Oct 18.
102. Oshima T, H. Aiba, Y. Masuda, S. Kanaya, M. Sugiura, BL. Wanner, H. Mori, T. Mizuno. 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol. Oct;46(1):281-91.
103. O'Toole, GA., and R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30:295-304.
104. Padera, RF. 2006 .Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. Cardiovasc Pathol. 15(5):264-70
105. Pedersen, SS. 1992. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. APMIS Suppl. 28:1-7.
106. Peña-Sandoval, GR., O. Kwon, D. Georgellis. 2005. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. J Bacteriol. 187:3267-3272.
107. Pernestig, AK., O. Melefors, and D. Georgellis. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 276:225-231.
108. Pernestig, AK., D. Georgellis, T. Romeo, K. Suzuki, H. Tomenius, S. Normark, O. Melefors. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. J Bacteriol. J. Bacteriol. 185(3):843-853.
109. Perraud, AL, B. Kimmel, V. Weiss, R. Gross. 1998. Specificity of the BvgAS and EvgAS phosphorelay is mediated by C-terminal HPt domains of the sensor protein. Mol Microbiol. 27:875-887.
110. Pessi, G., and D. Haas, 2001. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. FEMS (Fed. Eur. Microbio. Soc). Microbiol. Lett. 200:73-78.
111. Posas, F., SM. Wurgler-Murphy, T. Maeda, EA. Witten, TC. Thai, H. Saito, 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a

- multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*. 20;86(6):865-75.
112. Pratt, LA., and R. Kolter. 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:598-603.
113. Prouty, AM., JS. Gunn. 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun.* 68(12):6763-9.
114. Rahme, LG., MW. Tan, L. Le, SM. Wong, RG. Tompkins, SB. Calderwood, and FM. Ausubel. 1997. Use of model plant host to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13245-13250.
115. Regelman, AG., Lesley JA, Mott C, Stokes L, Waldburger CD. 2002. Mutational analysis of the *Escherichia coli* PhoQ sensor kinase: differences with the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoQ protein and in the mechanism of Mg²⁺ and Ca²⁺ sensing. *J Bacteriol.* 184(19):5468-78.
116. Reidl, J., and KE. Klose. 2002. *Vibrio cholerae* and the cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbio Rev.* 26:125-139.
117. Reimmann, C., M. Beyeler, A. Latifi, H. Winteler, M. Foglino, A. Lazdunski, D. Haas. 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.* 24:309-319.
118. Reimmann, C., C. Valverde, E. Kay, D. Haas. 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.* Jan;187(1):276-85.
119. Rich, JJ., TG. Krincherf, T. Kitten, and DK. Willis. 1994. Genetic evidence that the gacA gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae* J. *Bacteriol.* 176: 7468-7475.
120. Rodríguez, C., O. Kwon, D. Georgellis. 2004. Effect of D-lactate on the

- physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186. (7):2085-90.
121. Roggiani, M., D. Dubnau. ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of *srFA*. *J Bacteriol.* 175:3182-3187.
122. Romeo, T., M. Gong, MY. Liu, and A.-M. Brun-Zinkernagel. 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.
123. Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB *Mol. Microbiol.* 29: 1321-1330.
124. Sabnis, NA., H. Yang, T. Romeo. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem.* 8;270(49):29096-104.
125. Sahu, SN., S. Acharya, H. Tuminaro, I. Patel, K. Dudley, JE. LeClerc, TA. Cebula, S. Mukhopadhyay. 2003. The bacterial adaptive response gene, *barA*, encodes a novel conserved histidine kinase regulatory switch for adaptation and modulation of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biochem.* 253(1-2):167-77.
126. Saizieu A, GardèsC, Flint, N Wagner, C KamberM, Mitchell TJ, KeckW,. Amrein KE,¹ and Lange R. 2000. Microarray-Based Identification of a Novel *Streptococcus pneumoniae* Regulon Controlled by an Autoinduced Peptide. *J Bacteriol.* 182(17): 4696–4703.
127. Schaefer, AL., DL. Val, BL. Hanzelka, JE Jr. Cronan, EP. Greenberg . 1996. Generation of cell-to-cell signals in QS: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* Lux I protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(18):9505-9509.
128. Schultz, JE., and A. Matin,. 1991. Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J. Mol.*

- Biol.* 218: 129–140.
129. Sganga, MW., and CE. Bauer. 1992 Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell*, 68, 945–954.
 130. Shimoike, T., T. Taura, A. Kihara, T. Yoshihisa, Y. Akiyama, K. Cannon, K. Ito. 1995. Product of a new gene, *syd* functionally interacts with *secY* when overproduced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 10:270(10):5519-5526.
 131. Shing, PK., AL. Schaefer, MR. Parsek, TO. Moninger, MJ. Welsh, and EP. Greenberg. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 407:762-764.
 132. Simona, G., V. Menean, C. Jourlin, M. Chippaux, MC. Pascal. 1994. The *torR* of *Escherichia coli* encodes a response regulator protein involved in the expression of the TMAO reductase genes. *J. Bacteriol.* 176:5601-5606.
 133. Simons, RW., F. Houmann, and N. Kleckner. 1987. improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53:85-96
 134. Soto, SM., A. Smithson, JP. Horcajada, JA. Martinez, JP. Mensa J. Vila. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 12(10):1034-6.
 135. Stevens, AM., JM. Sanders., NB. Shoemaker, AA. Salyers. 1992. Gene involved in production of plasmid like forms by *Bacteroides* conjugal chromosomal element share amino acid homology with two-component regulatory systems. *J. Bacteriol.*174:2935-2942.
 136. Steidle, A., M. Allesen-Holm, K. Riedel, G. Berg, M. Givskov, S. Molin, and L. Eberl. 2002. Identification and Characterization of an N-Acylhomoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing System in *Pseudomonas putida* Strain IsoF. *Appl Environ Microbiol.*68(12):6371-82.
 137. Stock, AM., VL. Robinson, PN. Goudreau. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69:183-215.

138. Sugiura, M., H. Aiba, T. Mizuno. 2003. Identification and classification of two-component systems that affect rpoS expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003. 67(7):1612-5.
139. Suzuki, K., X. Wang, T. Weilbacher, AK. Pernestig, O. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, T. Romeo. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 5130-5140.
140. Suzuki, K., P. Babitzke, SR. Kushner, T. Romeo. 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev.* 15;20(18):2605-17.
141. Swem, LR, BJ. Kraft, DL. Swem, AT. Setterdahl, S. Masuda, DB. Knaff, JM. Zaleski, CE. Bauer. 2003. Signal transduction by the global regulator RegB is mediated by a redox-active cysteine. *EMBO J.* Sep 15;22(18):4699-708.
142. Swift, S., Stewart GS, Williams P. 1996. The inner workings of a QS signal generator. *Trends Microbiol.* Dec;4(12):463-5.
143. Tan, MW., LG.Rahme, JA. Sternberg, RG. Tompkins, FM. Ausubel.1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2408-2413.
144. Tan, MW., S. Mahajan-Miklos,. and FM. Ausubel. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*96:715-727.
145. Taylor, BL., IB. Zhulin. 1999. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:479-506.
146. Taylor, BL., A. Rebbapragada, MS. Johnson. 2001.The FAD-PAS domain as a sensor for behavioral responses in *Escherichia coli*. *Antioxi Redox Signal.*3:867-879.
147. Teplitzki, M., RI. Goodier, BMM. Ahmer,. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J.*

- Bacteriol. 185(24):7257-7265.
148. Teplitski, M., RI. Goodier, BM. Ahmer. 2006. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 296 (7):449-466.
 149. Thomashow, LS. 1996. Biological control of plant root pathogens. Curr. Opin. Biotechnol. 7:343-347.
 150. Tomenius, H., AK. Pernestig, CF. Mendez-Catala, D. Georgellis, S. Normark, O. Melefors. 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(21):7317-24.
 151. Tomenius, H., AK. Pernestig, K. Jonas, D. Georgellis, R. Mollby, S. Normark, O. Melefors. 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. BMC Microbiol. Mar 10;6:27.
 152. Uhl, MA., JF. Miller. 1996. Integration of multiple domains in a two component sensor protein: The *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. EMBO J. 15:1028-1036.
 153. Utsumi, R., S. Katayama, M. Taniguchi, T. Horte, M. Ikeda, S. Igaki, H. Nakagawa, A. Miwa, H. Tanabe, M. Noda. 1994. Newly identified genes involved in the signal transduction of *Escherichia coli* K-12. Gene 140:73-77.
 154. Valverde, C., Heeb S, Keel C, Haas D. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 Mol Microbio. 50(4):1361-1379.
 155. Venturi, V. 2003. Control of rpoS transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? Mol Microbiol. Jul;49(1):1-9.
 156. Walters M., V. Sperandio. 2006. QS in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int J Med Microbiol. 296(2-3):125-31.
 157. Wang, X., AK. Dubey, K. Suzuki, CS. Baker, P. Babitzke, and T. Romeo. 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*,

- responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 56: 1648–1663.
158. Wei, B., S. Shin, D. LaPorte, A.J. Wolfe, T. Romeo. 2000. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J Bacteriol.* 182(6):1632-40.
159. Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Pruss BM, Babitzke P, Romeo T. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein *CsrA* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 40(1):245-256.
160. Weilbacher, T., K. Suzuki, A.K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C.S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, T. Romeo. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 48(3):657-70.
161. White, D., M.E. Hart, T. Romeo. 1996. Phylogenetic distribution of the global regulatory gene *csrA* among eubacteria. *Gene.* 5;182(1-2):221-223.
162. Wolfe, A.J. 2005. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev.*;69(1):12-50.
163. Wong, S.M., P.A. Carroll, L.G. Rahme, F.M. Ausubel, S.B. Calderwood. 1998. Modulation of expression of the *ToxR* regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infect Immun.* 66(12):5854-5861.
164. Yang, H, M.Y. Liu, T. Romeo . 1996. Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the *CsrA* gene product. *J Bacteriol.* 178(4):1012-1017.
165. Zhang, J.P., and S. Normarck,. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* 273:1234-1236.
166. Zhou, L., X.H. Lei, B.R. Bochner, B.L. Wanner. 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* 185(16):4956-72.

167. Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. Reimann, D. Haas. 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact.* Jul;16(7):634-44.