



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DEL ESTÍMULO FISIOLÓGICO DEL SISTEMA
DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS COMPONENTES
BarA/UvrY EN Escherichia coli

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Biol. RICARDO GONZÁLEZ CHÁVEZ

TUTOR

Dr. Dimitris Georgellis

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

Instituto de Fisiología Celular
UNAM

México, DF.

Agosto 2011



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.

APOYO ACADÉMICO

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Dimitris Georgellis (No. 226 Norte) perteneciente al Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Agradezco el apoyo económico recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de becario 230375, a través del programa de doctorado en ciencias biomédicas de la UNAM.

Así mismo agradezco a CONACYT, ICGEB y DEGAPA por los donativos económicos recibidos para la compra de equipo y material a través de los siguientes proyectos:

- 1) **“Control of microbial gene expression by extracellular stimuli”**. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) # proyecto 80684.
- 2) **“Signal transduction by the BarA/UvrY two-component system”**. International centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) Italia, # de proyecto CRPMEX008-02
- 3) **“Characterization of the BarA/UvrY two component signal transduction system of *Escherichia coli*”**. Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # proyecto IN219709.

Finalmente, agradezco a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel y al Sr. Pedro Hernández Trujillo por su apoyo técnico durante el periodo de investigación 2008-2011.

DEDICATORIAS

*A mi madre
Eloísa Chávez.*

Quisiera dedicar este trabajo a la persona que ha estado conmigo siempre, a la persona que ha compartido conmigo todos esos momentos de felicidad y de tristeza

Tu esfuerzo y dedicación que día a día has compartido conmigo, hoy se ven reflejados.

Gracias por inculcarme los principios y valores necesarios para alcanzar mis sueños y mis metas.

Hoy quiero darte las gracias por todo lo que me has brindado, por tus consejos, por tu apoyo incondicional y por tu amor.

Hoy quiero darle las gracias a Dios por darme una gran madre como tú....

Te quiero mucho mamá...

*A mi esposa
María Isela Miranda.*

*Quiero darle gracias a Dios porque me ha dado la oportunidad de tener
una esposa y dos hijos maravillosos.*

*Un día nos cruzamos en el camino, desde entonces pasaron muchas cosas
alegres y tristes pero jamás se separaron nuestras vidas, pudimos
conocernos y permanecer indiferentes, ser buenos amigos, pero Dios
sembró en nosotros el mismo amor en los dos.*

*Hoy viendo crecer y sonreír a nuestros hijos día con día, he aprendido a
valorar aún más la vida y los sentimientos.*

*He aprendido que el amor, la atención y el cariño que podemos ofrecerles
a nuestros hijos es la llave para que ellos también puedan tener éxito en
la vida.*

*Gracias por darme dos hijos hermosos, gracias por tu apoyo y por
brindarme tu amor incondicional....*

*A mis hijos:
Fernando González Miranda y Rafael González Miranda*

*Quiero darle gracias a Dios por darme la oportunidad de ser padre de
dos hijos maravillosos. Porque están sanos y con vida.*

*Desde que llegaron a mí, ustedes han sido mi inspiración para seguir
adelante y no dejarme caer en los momentos difíciles.*

*Cada momento que he vivido con ustedes ha sido especial y le doy
gracias a Dios porque están a mi lado.*

Siempre están en mi mente y en mi corazón.

Los quiero mucho y los amaré siempre.....

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Dimitris Georgellis por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por brindarme su apoyo, tiempo, dedicación y por depositar su confianza en mí para sacar este proyecto adelante. Pero sobre todo por las enseñanzas que día con día influyeron en mi persona para poder crecer como investigador.

Agradezco a los miembros del comité tutor, los doctores José Luís Puente García y Bertha González Pedrajo por el apoyo durante mis cuatro años de doctorado. Por sus consejos, observaciones y sugerencias para poder realizar un mejor trabajo de investigación.

Agradezco a los miembros del jurado, los doctores Georges Dreyfus Cortés, María Lourdes Girard Cuesy, Elda Guadalupe Espín Ocampo y Enrique Merino Pérez por la revisión de este trabajo. Sus críticas y observaciones fueron de gran ayuda para terminar con éxito mi proyecto de investigación.

Agradezco a mis hermanos, Araceli, Edmar, Miguel y Susana y sus respectivas familias por el apoyo que me han brindado para seguir adelante en mi carrera.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio, Claudia, Griselda, Martha, Carlos, Adrián, Pedro y Diego por todos los momentos compartidos durante mis estudios doctorales.

Agradezco a la familia Miranda Vázquez por su apoyo y comprensión en cada momento. Pero sobre todo por la confianza que han depositado en mí

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
I. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS COMPONENTES	10
A. Estructura de las proteínas cinasas sensoras (CS)	11
B. Estructura de las proteínas reguladoras de respuesta (RR)	12
C. Estímulos fisiológicos y su interacción con las proteínas CS	14
D. Mecanismo de señalización en los sistemas de dos componentes	16
II. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA BarA/UvrY EN <i>Escherichia coli</i>	18
A. Estructura de BarA	18
B. Estructura de UvrY	19
C. Función del sistema BarA/UvrY en <i>Escherichia coli</i> y sus homólogos	20
III. IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS BarA/UvrY y CsrA/CsrB EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO EN <i>Escherichia coli</i>	22
ANTECEDENTES	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27

MÉTODOS	28
Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este estudio	28
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	28
Determinación de la actividad β-galactosidasa	29
Cuantificación del acetato extracelular	30
RESULTADOS	31
Parte I. Resultados publicados	32
Parte II. Resultados no publicados	36
A. La forma permeable de los ácidos carboxílicos activa al sistema BarA/UvrY	36
B. Región común de BarA en el reconocimiento del estímulo	37
C. Activación del sistema BarA/UvrY en condiciones alcalinas (pH 7.0).	39
D. Mecanismo de regulación del sistema BarA/UvrY dependiente de CsrA	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

El sistema de transducción de señales de dos componentes BarA/UvrY está constituido por una proteína cinasa de histidina BarA y una proteína reguladora de respuesta UvrY. Este sistema en *Escherichia coli* y en sus homólogos en otras bacterias gram negativas, tales como BarA/SirA en *Salmonella*, ExpS/ExpA en *Erwinia*, VarS/VarA en *Vibrio* y GacS/GacA en diferentes especies de *Pseudomonas*, controlan positivamente la expresión de RNAs no codificantes, CsrB (RsmY) y CsrC (RsmZ). Estos RNAs pequeños junto con la proteína CsrA (Carbon storage regulation) regulan a nivel postranscripcional el metabolismo central del carbono, la motilidad y la formación de biopelículas. La señal fisiológica que regula la actividad de BarA en *E. coli* y en sus homólogos aún no se ha identificado. Estudios recientes han demostrado que en condiciones de crecimiento en donde los valores de pH son inferiores a 5.5 no se activa el sistema BarA/UvrY. En este trabajo se realizaron diferentes experimentos con el objetivo de identificar el estímulo ambiental al que responde BarA. Nuestros resultados indicaron que el formato, el acetato y otros ácidos carboxílicos de cadena corta actúan como estímulos para activar al sistema de dos componentes BarA/UvrY. Finalmente, se discuten las implicaciones de estos resultados en la fisiología general de la célula.

ABSTRACT

The BarA/UvrY two-component system (TCS) of *Escherichia coli* comprises the BarA protein as the histidine sensor kinase (SK) and UvrY as the cognate response regulator (RR). This system, which its homologues in other gram-negative bacteria, such as BarA/SirA of *Salmonella*, ExpS/ExpA of *Erwinia*, VarS/VarA of *Vibrio*, and GacS/GacA of *Pseudomonas* species, have been shown to positively control expression of the noncoding CsrB (RsmY) and CsrC (RsmZ) RNAs. These small regulatory RNAs together with the CsrA protein constitute the Csr (carbon storage regulation) system, a post-transcriptional regulatory system that has profound effects on central carbon metabolism, motility and biofilms formation.

No physiological signals able to regulate the BarA sensor kinase and thereby control the UvrY response regulator have so far been identified for any of the orthologous TCSs. However, in a recent study it was demonstrated that pH lower than 5.5 provides an environment that does not allow activation of the BarA/UvrY signaling pathway. Here, we present experiments aiming at identifying the environmental signal(s) to which BarA respond(s). Our results indicate that formate, acetate as well as other aliphatic short chain fatty acids act as stimulus that activate the BarA/UvrY two component system. The implications of our findings on the overall physiology of the cell are discussed.

INTRODUCCIÓN

I. SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOS COMPONENTES

La vida en el mundo microbiano se caracteriza por la continua interacción entre la célula bacteriana y su entorno. Por tal motivo, durante el proceso evolutivo, las bacterias han desarrollado diversas estrategias que les permiten responder de forma eficiente a los cambios en los factores ambientales, tales como la presión osmótica, la fuerza iónica, el pH, la luz, la temperatura y la concentración de nutrientes, entre otros. Una de estas estrategias, ha sido la utilización de los sistemas de transducción de señales de dos componentes (SDC), los cuales tienen como función principal, percibir los estímulos ambientales, integrarlos y generar una respuesta específica que conduce a una rápida adaptación bacteriana a su nuevo ambiente (10, 100, 111).

En general, los sistemas de dos componentes se encuentran constituidos por una proteína cinasa de histidina o cinasa sensora (CS) transmembranal y una proteína reguladora de respuesta (RR) citoplásmica. El modelo prototipo de señalización, se basa fundamentalmente en la autofosforilación de la proteína CS en respuesta a un estímulo específico. En consecuencia se lleva a cabo la transferencia del grupo fosforilo a la proteína RR, la cual interacciona con el DNA en secuencias promotoras específicas para regular diferencialmente la expresión genética (48, 85,101).

Estos sistemas se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en arqueas, levaduras y plantas. Sin embargo, en bacterias se encuentran con mayor frecuencia (111). En general, estos sistemas son de gran importancia para los microorganismos, ya que participan de forma importante en la regulación de diferentes procesos celulares, entre los que destacan la regulación del metabolismo del carbono, nitrógeno y fósforo, la expresión de factores de virulencia, la osmoregulación, la quimiotaxis, la biosíntesis flagelar, la esporulación y la producción de cuerpos fructíferos, entre otros (9, 10, 11, 15, 28, 36, 47, 63, 70, 86, 101,107)

A. Estructura de las proteínas cinasas sensoras (CS)

De acuerdo con la arquitectura y disposición secuencial de sus dominios, las proteínas CS se pueden clasificar en dos grupos principales. El primero está conformado por las CS prototipo u ortodoxas, mientras que el segundo está representado por las CS no ortodoxas o híbridas. En ambos grupos las CS se caracterizan por la presencia de un segmento citosólico N-terminal y un par de segmentos transmembranales (TM1 y TM2) unidos por un puente periplásmico, que en su conjunto es denominado dominio receptor, en donde generalmente se percibe el estímulo. Éste se conecta a una segunda región denominada dominio transmisor, que se caracteriza por la presencia de un residuo de histidina conservado (H) al que se asocia la actividad autocinasa (Figura 1A). Por el contrario, las CS híbridas contienen adicional al dominio transmisor, un dominio receptor central que se caracteriza por la presencia de un residuo de aspartato (D) conservado y un dominio de fosfotransferencia C-terminal también conocido como dominio HPT (His-containing phosphotransfer) que se caracteriza por la presencia de un residuo de histidina (H) conservado (Figura 1B) (37, 100, 111)

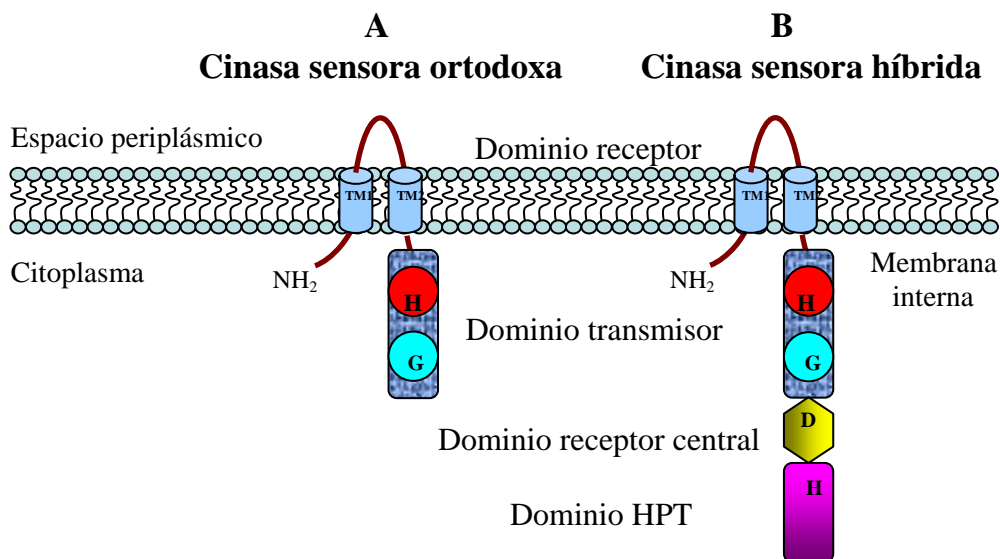


Figura 1. Estructura de las proteínas CS. En la figura (A) se muestra la estructura típica de una CS ortodoxa, la cual se caracteriza por la presencia de un residuo de histidina (H) conservado y una región de unión a ATP en el dominio transmisor (caja G). En la figura (B) se representa la estructura de una CS híbrida que se caracteriza por la presencia de un dominio receptor central y un dominio HPT en los que encuentran conservados los residuos de aspartato (D) e histidina (H), respectivamente.

Otros elementos estructurales en las CS pueden ser localizados en la región “linker”, entre el segundo segmento transmembranal y el dominio transmisor. Por ejemplo, el dominio PAS (PER: period clock protein, ARNT: vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, SIM: *Drosophila* single-minded protein) que esta involucrado en la percepción del potencial rédox, la intensidad de luz y en la concentración de oxígeno (105). El dominio HAMP (histidine kinases, adenylyl cyclases, methyl-accepting proteins and other prokaryotic signaling proteins) que participa en la regulación del estado de fosforilación o metilación de las CS diméricas, mediante la transmisión de los cambios conformacionales que se producen en el dominio periplásmico hacia los dominios catalíticos como consecuencia de la interacción con el estímulo (4, 106). También es posible localizar dominios GAF (c-GMP-specific and c-GMP-stimulated phosphodiesterases, *Anabaena* adenylate cyclases and *Escherichia coli* FhlA) que promueven el proceso de dimerización en las CS e interactúa con los nucleótidos cíclicos GMPc y AMPc regulando los niveles intracelulares de estos segundos mensajeros (5, 54).

B. Estructura de las proteínas reguladoras de respuesta (RR).

Los RR prototipo generalmente se encuentran constituidos por dos dominios estructurales. El dominio receptor en la región N-terminal que se caracteriza por la presencia de un residuo de aspartato conservado (D2) y el dominio efector C-terminal de secuencia variable (Figura 2) (32, 111).

Regulador de respuesta (RR)

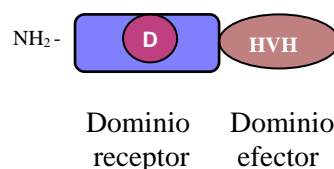


Figura 2. Estructura de las proteínas RR. En la figura se muestra la estructura típica de un RR, el cual se caracteriza por la presencia de un residuo de aspartato (D) conservado en el dominio receptor y una región variable en el dominio efector que generalmente participa en la unión al DNA en conformación hélice-vuelta-hélice (HVH).

La función principal del aspartato (D) conservado en el dominio receptor es aceptar grupos fosforilo a partir de un residuo de fosfo-histidina en el dominio transmisor de la CS. Sin embargo, un catión divalente adyacente al sitio de fosforilación es necesario para adicionar o remover grupos fosforilo en el dominio receptor. Generalmente, el metal asociado es el ión Mg^{2+} , sin embargo otros cationes divalentes (en particular en Mn^{2+}) pueden tener la misma función (12, 100). Alternativamente, los RR también pueden catalizar su propia fosforilación independientemente de la actividad de su CS a través de la interacción con pequeñas moléculas donadoras de fosfato, tales como el acetil-fosfato, el carbamil-fosfato, el imidazol-fosfato y el fosforamidato (33, 67, 68, 100). Dicha interacción desplaza el estado conformacional del RR hacia la forma activa, promoviendo en muchos casos la dimerización, la interacción con otras proteínas o incluso con el DNA. Sin embargo, en algunos casos el estado de fosforilación no corresponde a la activación del RR. Por ejemplo, en levaduras el RR Ssk1 implicado en la osmoregulación es considerado inactivo en su estado fosforilado (70).

Por otra parte, los dominios efectores en los RR pueden ser clasificados funcionalmente en su mayoría como regiones de unión a ácidos nucleicos (63% para DNA y 1% para RNA) (87, 98). Sin embargo, pueden encontrarse dominios de unión a proteínas (3%) o incluso con función enzimática (13%), como es el caso de la región C-terminal de la metilesterasa CheB de *Salmonella* y la AMPc fosfodiesterasa RegA de *Dictyostelium* (25).

La diversidad en la estructura, organización y combinación de los dominios en los RR, permite a las células bacterianas generar una gran variedad de respuestas mediante la regulación diferencial de la transcripción, la actividad enzimática, y/o las interacciones proteína-proteína, aumentando su capacidad de adaptación al medio ambiente (32, 33).

C. Estímulos fisiológicos y su interacción con las proteínas CS.

La naturaleza del estímulo que perciben los sistemas de dos componentes, en la mayoría de los casos aún se desconoce. Sin embargo en otros casos, las señales o las condiciones ambientales en donde las CS se encuentran activas se han identificado (Tabla 1) (57,69)

Tabla 1. Sistemas de dos componentes asociados a su molécula de señalización.

Sistemas de dos componentes	Estímulo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
ArcB/ArcA	Quinonas asociado al estado rédox.	(34, 71)
PhoQ/phoP	Péptidos antimicrobianos y Mg ²⁺	(21, 90)
BasS/BasR	Hierro.	(42)
CusS/cusR	Cobre	(80)
NarX/NarL	Nitrato y Nitrito.	(20, 61)
NarQ/NarP	Nitrato y Nitrito.	(99)
DcuS/DcuR	C4-Dicarboxilatos (Citrato, Fumarato)	(56)
CheA/CheY	Quimioatrayentes (Serina y Aspartato).	(63)
NtrB/NtrC	Glutamina y 2-cetoglutarato	(53)
KdpD/KdpE	(K ⁺) y baja presión de turgencia.	(29)
QseC/QseB	(AI-3), Epinefrina/Norepinefrina	(17)
PhoR/PhoB	Limitación de fosfato.	(9)
EnvZ/OmpR	K ⁺ , Osmolaridad y Procaína	(89, 119)
TorS/TorR	N-óxido de trimetilamina (TMAO).	(77)
AtoS/AtoC	Acetoacetato, espermidina e histamina	(38)
CpxA/CpxR	Lipoproteína NlpE	(97, 117)
Otros organismos		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CitA/CitB)	Citrato	(55)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (MtrB/MtrA)	Osmolaridad.	(76)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (FixL/FixJ)	Oxígeno (O ₂).	(35, 75)
	Monóxido de carbono (CO).	
	Oxido nítrico (NO).	
<i>Caulobacter crescentus</i> (LovK/LovR)	Luz azul	(88)
<i>Pseudomonas putida</i> (TodS/TodT)	Tolueno	(16)
<i>Streptomyces coelicolor</i> (VanS/VanR)	Vancomicina	(49)
<i>Bordetella pertussis</i> (BvgS/BvgA)	Temperatura, ión sulfato y ácido nicotínico.	(74, 108)
<i>Vibrio harveyi</i> (LuxQ/LuxO)	(AI-2) Quórum Sensing	(83, 84)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (CsrS/CsrR)	Mg ²⁺	(39)
<i>Helicobacter pylori</i> (ArsS/ArsR)	pH	(81)
<i>Bacillus subtilis</i>		
DesR/DesK	Temperatura.	(1)
BceS/BceR	Bacitracina	(92)
KinB/Spo0F	ATP	(15)

En tabla se muestran los sistemas de dos componentes de *E. coli* y de otros organismos a los que se les ha asociado un estímulo o condición ambiental de activación. Tabla modificada y actualizada a partir de Krell, et al 2010 y Mascher, et al 2006.

Sin embargo, el estudio de los sitios de reconocimiento en las CS es de gran importancia para determinar el mecanismo molecular por el cual se percibe el estímulo. En este sentido, se han identificado tres regiones principales en las CS que son esenciales para el reconocimiento. En primer lugar se encuentran las CS que perciben el estímulo en las regiones periplásmicas, en donde el dominio receptor y el dominio transmisor se localizan en diferentes compartimientos celulares, los cuales al estar separados por una membrana requieren de las regiones transmembranales para transducir el estímulo (Figura 3A). Este tipo de CS es típica para la detección de solutos y nutrientes (Ejemplo: DcuS/DcuR) (56, 69). En segundo lugar se encuentran las CS que perciben el estímulo en las hélices transmembranales o en combinación con los bucles extracelulares cortos. (Figura 3B). Este tipo de CS puede reconocer estímulos intracelulares, gradientes electroquímicos o incluso moléculas autoinducidas de tipo “Quórum Sensing” (Ejemplo: LuxN/LuxO) (83, 84, 69).

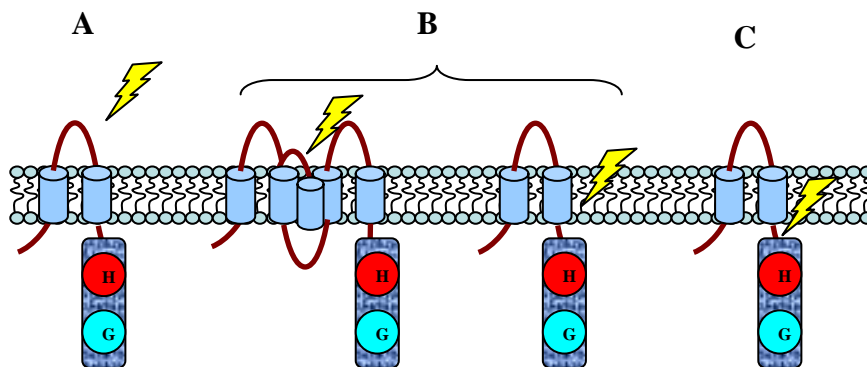


Figura 3. Sitios de reconocimiento del estímulo por parte de las CS. En la figura 3A se muestra el esquema de las CS que perciben el estímulo en la región periplásmica (NarX/NarQ). En la figura 3B se muestra el esquema de la CS que puede reconocer el estímulo a través de los bucles extracelulares o incluso por medio de las α -hélices intermembranales (LuxN/LuxO). En la figura 3C se representa a las CS que pueden reconocer el estímulo en la región citoplásmica que generalmente se asocia a la región “linker” (ArcB/ArcA). Tomado de Mascher, et al 2006.

En tercer lugar se encuentran las CS que reconocen el estímulo en la región citoplásmica. Como ejemplo se puede mencionar a la CS ArcB de *E. coli*, que al ser oxidados dos residuos de cisteínas localizados en la región “linker” por acción de el pool de quinonas oxidadas (ubiquinona Q), inducen la formación intermolecular de dos puentes disulfuro con lo cual se inhibe su actividad cinasa (Figura 3C) (34, 58, 71, 72).

D. Mecanismo de señalización en los sistemas de dos componentes.

Durante la interacción física con el estímulo, se induce un cambio conformacional en la CS que permite su activación y en consecuencia es capaz de transmitir la información recibida hacia su RR a través de la transferencia sucesiva de grupos fosforilo. El estado funcional de este mecanismo es controlado por tres reacciones principales. Durante la etapa de activación la CS cataliza la hidrólisis de una molécula de ATP generando ADP + P_i. Como consecuencia, se inicia la primera reacción de fosfotransferencia en la que el grupo fosforilo (P_i) se transfiere hacia un residuo de histidina conservado (H) en el dominio transmisor (reacción de autofosforilación). Consecutivamente, se lleva a cabo la segunda reacción de fosfotransferencia en la que se transmite el grupo fosforilo a un residuo de aspartato conservado (D) en el dominio receptor del RR. Finalmente, durante la tercera reacción de fosfotransferencia se lleva a cabo la desfosforilación del RR para regresar al estado pre-estímulo. Ésta última reacción puede ser catalizada por la CS a través del fosforelevo reverso D→H→D→P_i (actividad fosfatasa) o puede ser una propiedad intrínseca (actividad autofosfatasa) del RR (Figura 4A). En el caso de las CS híbridas, la fosforilación de sus RR se produce a través del mismo relevo de fosfatos. En donde la reacción inicial de autofosforilación por parte de las CS se mantiene. Sin embargo en las reacciones sucesivas la transferencia del grupo fosforilo ocurre de forma secuencial hacia un residuo de aspartato conservado (D) en el dominio receptor central y hacia un residuo de histidina conservado (H) en el dominio HPT, respectivamente. Finalmente, el grupo fosforilo es transferido hacia un residuo de aspartato conservado (D) en el dominio receptor del RR (Figura 4B) (85, 100, 101, 111).

En el mundo microbiano es posible encontrar sistemas de dos componentes constituidos por cuatro proteínas individuales, como es el caso del sistema KinA/Spo0F/Spo0B/Spo0A en *Bacillus subtilis* (15, 57). Incluso pueden encontrarse CS que contienen dos o más dominios con actividad autocinasa. Tal es el caso del sistema TodS/TodT en *Pseudomonas putida* (16). Sin embargo a pesar de la gran diversidad entre el número y organización espacial

de los dominios en los sistemas de dos componentes, la reacción general de fosfotransferencia ($H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$) se conserva (57) (Figura 4CD).

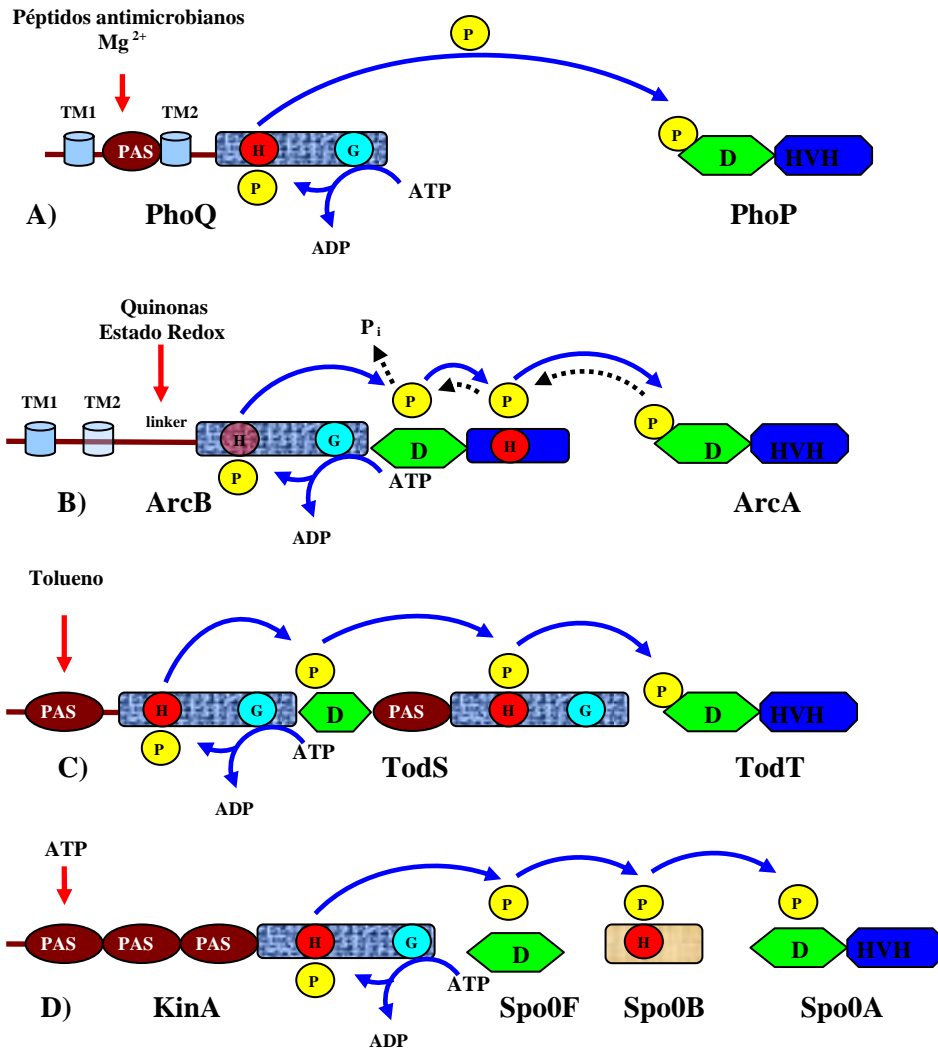


Figura 4. Mecanismo de señalización en los sistemas de transducción de señales de dos componentes. En presencia del estímulo, las CS llevan a cabo su autofosforilación en un residuo H conservado. En la figura 4A se muestra la transferencia del grupo P_i hacía el RR a partir de una CS prototipo ($H \rightarrow D$). En la figura 4B se muestra la transferencia del grupo P_i hacía el RR a partir de una CS híbrida ($H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$). También se muestra el fosforelevo reverso $D \rightarrow H \rightarrow D \rightarrow P_i$ en líneas punteadas. En las figuras 4C y 4D se muestra la transferencia del grupo P_i hacía el RR a partir de CS que presentan dos o más dominios catalíticos organizados en una o más proteínas. En estos casos, la reacción general de fosfotransferencia $H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$ se mantiene.

II. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA BarA/UvrY EN *Escherichia coli*

En *E. coli* se han identificado 30 proteínas CS y 32 proteínas RR, dentro de las cuales se encuentran BarA y UvrY, respectivamente (51).

A. Estructura de BarA

BarA (bacterial adaptive response) es una proteína CS híbrida de 918 residuos de aminoácidos, constituida por dos regiones transmembranales (TM1-TM2) y tres módulos catalíticos (dominio transmisor primario, dominio receptor primario y dominio transmisor secundario). El primero de estos módulos, se caracteriza por la presencia de un residuo de histidina conservado (H302) al que se asocia la reacción de autofosforilación. También es posible localizar cuatro determinantes catalíticos (N, D, F y G) que son importantes durante el reconocimiento y la catálisis del ATP. La característica más importante del segundo y tercer módulo catalítico es la presencia de un residuo de aspartato (D) en la posición 718 y un residuo de histidina (H) en la posición 861, respectivamente. Ambos residuos son esenciales durante el mecanismo de fosfotransferencia (Figura 5) (51, 82)

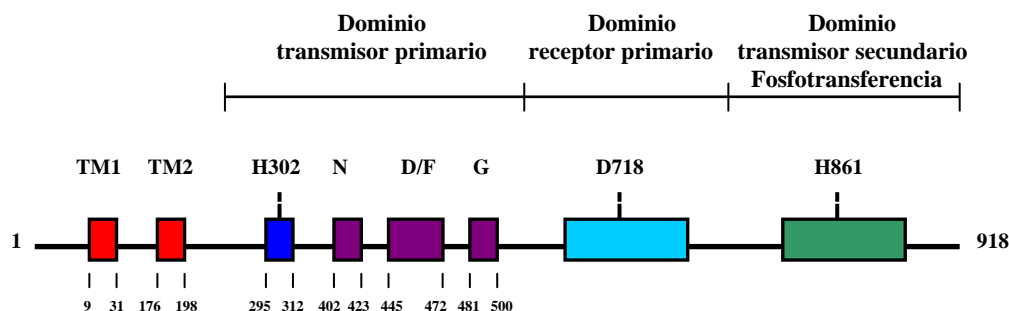


Figura 5. Estructura de BarA. En la figura se muestran los dominios y regiones estructurales más importantes de BarA. Las regiones transmembranales (TM1 y TM2) se encuentran conectadas con los dominios catalíticos a través de la región "linker" (198-205). Dentro de los tres dominios catalíticos (dominio transmisor primario, dominio receptor primario y dominio transmisor secundario) se muestran los residuos de aminoácidos que tienen una función esencial en el mecanismo de autofosforilación y de fosfotransferencia. Simbología: H (Histidina), N (Asparagina), D (Aspartato), F (Fenilalanina), G (Glicina). Tomado de Pernestig, et al 2001.

Basado en el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de BarA, se ha propuesto la presencia de posibles dominios GAF (36-200), HAMP (200-252) y PAS (200-350) en la región “linker”. Adicionalmente, el análisis de diferentes mutaciones en el dominio HAMP indicó que dicha región es esencial para inducir los cambios conformacionales producidos por el reconocimiento del estímulo y para la actividad cinasa. Además el análisis *in vivo* demostró que BarA puede organizarse en un dímero, incluso para llevar a cabo la actividad de desfosforilación (106).

A. Estructura de UvrY

El RR de BarA es UvrY. Su nombre deriva del estrecho vínculo que existe con el gene *uvrC*, el cual forma una sola unidad bicistrónica transcripcional con *uvrY*. El gene *uvrC* codifica para una subunidad de la enzima UvrABC, la cual participa en la reparación del DNA durante la exposición a rayos UV. Sin embargo, se ha observado que la presencia de diferentes mutaciones en *uvrY* no afecta el mecanismo de reparación del DNA (79). UvrY es una proteína de 218 residuos de aminoácidos que se caracteriza por la presencia de un dominio receptor secundario y un dominio de unión al DNA en conformación hélice-vuelta-hélice. (HVH). Dentro del dominio receptor se localiza un residuo de aspartato conservado (D) en la posición 54 que funciona como aceptor de grupos fosforilo durante la reacción de transfosforilación (Figura 6) (87).

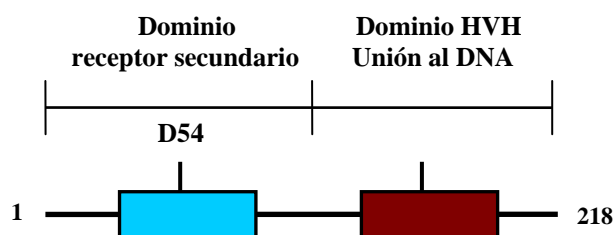


Figura 6. Estructura de UvrY. En la figura se muestra el dominio receptor secundario en la región N-terminal y el dominio de unión al DNA del RR UvrY. Esta proteína de 218 residuos de aminoácidos es considerado un factor transcripcional perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales FixJ (32). Tomado de Pernestig, et al 2001.

C. Función del sistema BarA/UvrY en *Escherichia coli* y sus homólogos.

Dentro del grupo de las γ -proteobacterias se han identificado proteínas ortólogas del sistema BarA/UvrY. Tal es el caso de BarA/SirA en *Salmonella enterica* (36), ExpS/ExpA o GacS/GacA en *Erwinia carotovora* (23), VarS/varA en *Vibrio cholerae* (62), LetS/LetA en *Legionella pneumophila* (43), GacS/GacA en diferentes especies de *Pseudomonas* (27), GacS/GacA en *Azotobacter vinelandi* (18, 19), PigW/PigQ en *Serratia marcescens* (115) y GacS/GacA en *Acinetobacter baumannii* (24, 59, 87). También se han identificado ORFs con un porcentaje de identidad mayor al 70% en los genomas de *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis* y *Shewanella putrefaciens* (87). En biología evolutiva, se considera que las proteínas ortólogas tienen la misma función en diferentes organismos. En este sentido, se ha descrito que mutantes en BarA o SirA en *Salmonella enterica* presentan una reducción significativa en su capacidad para invadir cultivos células epiteliales, debido a que este sistema regula la expresión de genes involucrados en la producción del sistema de secreción tipo III que se requiere para translocar en la célula eucarionte diferentes receptores que promueven con mayor eficiencia la adherencia bacteriana a su célula huésped. Así mismo se ha demostrado que SirA regula la expresión de *hilA*, *hilC* y *csrB* mediante la unión a sus regiones promotoras. En particular, HilA regula la expresión de genes contenidos en las islas de patogenicidad SPI1, SP14 y SP15, promoviendo la producción de proteínas que se requieren durante la motilidad y la invasión bacteriana a la célula huésped durante el proceso de infección (3, 28, 36).

La enfermedad de la pudrición blanda (Soft rot) causada por *Erwinia carotovora* en los tubérculos de las plantas de cultivo (papas) se caracteriza por una amplia maceración del tejido infectado. La maceración es el resultado de la producción de enzimas que degradan la pared celular, tales como las pectinasas extracelulares, celulasas y proteasas (22, 30). Al respecto, se ha demostrado que el sistema GacS/GacA controla la producción tanto de metabolitos secundarios como de enzimas extracelulares que promueven el proceso de patogénesis en las plantas de cultivo (50, 65).

En *Vibrio cholerae*, la producción de toxinas y la formación de pilis que se requieren durante el proceso de infección dependen de la expresión del sistema VarS/VarA. Como consecuencia, cepas mutantes en VarA reducen la capacidad de colonización en ratones lactantes infectados. (62, 91).

Legionella pneumophila es una bacteria patógena intracelular que causa la neumonía o enfermedad de los legionarios. Se desarrolla en amebas y macrófagos alveolares humanos. Su capacidad de sobrevivencia y replicación es mediante la manipulación de las funciones de la célula huésped para reprogramar la vía de degradación endosomal-lisosomal de las células fagocíticas, evitando así su degradación. Así mismo, forma vacuolas aisladas a partir de la red endosomal a través de la formación del sistema de secreción tipo IV (Dot/Icm) que es considerado un factor de virulencia esencial en el proceso de infección. En este sentido, se ha demostrado que el sistema LetS/LetA/Rsm/CsrA participa en la expresión de factores de virulencia producidos durante la fase estacionaria (31, 43).

Se conoce que el sistema GacS/GacA en *Pseudomonas aeruginosa* a través del sistema Rsm regula positivamente la expresión de diversos factores de virulencia, entre los que se encuentran la formación del sistema de secreción tipo III y la expresión de proteínas que son exportadas a través del sistema de secreción tipo II (14, 44, 45, 122).

Utilizando como modelos de estudio, embriones de pollo y monos *Macaque fascicularis* con problemas de cistitis, se demostró que el sistema BarA/UvrY en diferentes cepas patógenas de *E. coli* (APEC O78:K80:H9 y UPEC SD17) es un factor determinante en los procesos de virulencia. Además participa en el recambio metabólico entre las diferentes fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas (13, 46, 86, 107).

De acuerdo con las evidencias anteriores, en las primeras cinco especies ortólogas así como en diferentes cepas patógenas de *E. coli* se demostró que el sistema BarA/UvrY es un importante regulador de virulencia y patogénesis. Indicando que éste es un mecanismo conservado evolutivamente en patógenos que pertenecen al grupo de las γ -proteobacterias (59).

III. IMPORTANCIA DE LOS SISTEMAS BarA/UvrY y CsrA/CsrB EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO EN *Escherichia coli*

Diversos estudios indican que el sistema BarA/UvrY en *E. coli* y sus ortólogos controlan positivamente la expresión de RNAs pequeños no codificantes, CsrB y CsrC en *E. coli* y sus homólogos RsmY y RsmZ en diferentes especies. En *E. coli* estos RNAs de estructura secundaria tipo talloasa se encuentran constituidos por 369 y 242 nucleótidos, respectivamente (59, 62, 94, 109, 114). La función principal de estos RNAs es secuestrar y antagonizar la función de la proteína de unión a RNA CsrA (Carbon storage regulation) a través de la formación de un complejo RNA-proteína (40, 41 64, 66, 93). Dicha interacción es posible gracias a la afinidad de CsrA por las secuencias repetidas GGA que se localizan principalmente en las asas de la estructura secundaria de estos RNAs pequeños (26). Por el contrario, CsrA en su estado libre interactúa con diferentes RNAs mensajeros para regular positiva o negativamente la expresión genética a nivel postranscripcional (95, 103). Se sabe que CsrA puede activar la expresión de genes involucrados en la vía de glucólisis, el ciclo del glioxalato, la motilidad, la biosíntesis flagelar y el metabolismo del acetato (86, 112, 113). Así mismo tiene la capacidad de reprimir la expresión de genes involucrados en la síntesis y degradación del glucógeno, la gluconeogénesis y la formación de biopelículas (8, 52, 86, 110, 118). Sin embargo, por un mecanismo aún desconocido, CsrA puede activar directa o indirectamente la expresión de CsrB y CsrC vía el sistema BarA/UvrY, inhibiendo su propia actividad. Alternativamente CsrA regula negativamente la expresión de la proteína CsrD. Sin embargo, CsrD en su estado funcional, tiene la capacidad de unirse a CsrB y CsrC para promover la degradación de estos RNAs pequeños por acción de la enzima RNasa E (102). Este circuito regulador mantiene un equilibrio homeostático en *E. coli* durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria como respuesta a las condiciones de crecimiento.

Otros elementos que participan en este circuito regulador pertenecen al sistema de “Quorum Sensing”. El gen *sdiA* codifica para una proteína perteneciente a la familia LuxR, llamada SdiA. Este factor transcripcional se encuentra constituido por un dominio de unión a N-acil-homoserina-lactona (AHL) y un dominio de unión a DNA. En presencia de indol y/o AHL, SdiA se une al promotor de *uvrY* mediante la secuencia consenso 5'-AAAAGNNNNNNNGAAAA -'3 para activar su transcripción. Sin embargo, *E. coli*, *Salmonella* y *Klebsiella* no pueden sintetizar AHL, lo que sugiere que SdiA es un receptor que detecta señales provenientes de otras especies bacterianas que son dependientes de la densidad celular (Figura 7). (2, 83).

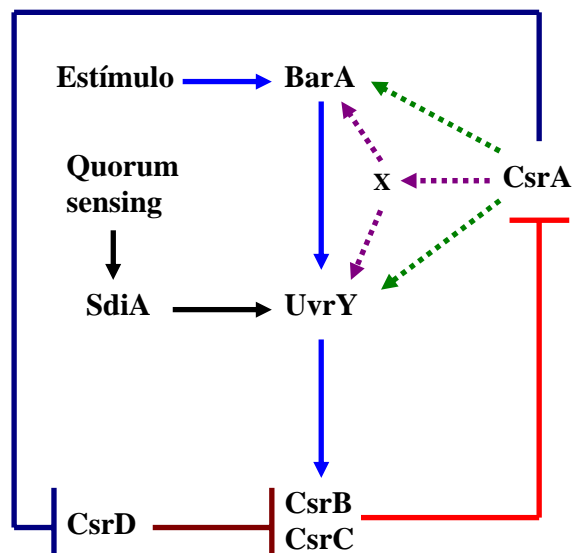


Figura 7. Circuito de regulación entre el sistema BarA/UvrY y el sistema Csr. En presencia de un estímulo, BarA transfiere el grupo fosforilo UvrY. Este regulador transcripcional activa la expresión de dos RNAs no traducibles, CsrB y CsrC, los cuales secuestran a la proteína CsrA para inhibir su función. En su estado libre CsrA puede regular positiva o negativamente a nivel postranscripcional diferentes genes blanco. Sin embargo, también puede regular directa o indirectamente a través de un factor X, la expresión de CsrB y CsrC vía el sistema BarA/UvrY. Así mismo, puede regular negativamente la expresión de la proteína CsrD. Por el contrario, cuando se expresa CsrD promueve la degradación de CsrB y CsrC por la acción de la enzima RNasa E. Por otra parte, en presencia de indol y AHL *sdiA* regula positivamente la transcripción de UvrY.

ANTECEDENTES

A pesar de que el sistema BarA/UvrY en *E. coli* y sus ortólogos desempeñan un papel importante en diversos procesos celulares, el estímulo fisiológico que regula su actividad no se ha identificado. Ciertos estudios sugieren que BarA puede responder a un estímulo proveniente del organismo huésped durante la colonización (121). Sin embargo, la evidencia experimental demuestra que este sistema se encuentra activo en ausencia de la célula huésped (103).

Estudios recientes se han dirigido hacia la búsqueda y caracterización del estímulo y las condiciones ambientales de activación. Se conoce que durante el crecimiento bacteriano en presencia de azúcares y cuando la disponibilidad de oxígeno es limitante, se producen ácidos orgánicos que se excretan al medio, produciendo una disminución en el pH externo. Por el contrario, cuando el crecimiento bacteriano es en presencia de aminoácidos, se generan aminas alcalinas, produciendo el efecto contrario en el pH. Para explorar el efecto del pH externo sobre la actividad del sistema BarA/UvrY en *E. coli*, se determinó el crecimiento de la cepa silvestre KSB837 que contiene la fusión cromosómica transcripcional Φ (*csrB-lacZ*) tanto en medio LB suplementado con 0.1 M de *N-N'*-bis-2-ácido etanosulfónico (HOMOPIPES) para mantener el pH a 5.0, como sin este amortiguador, en ensayos independientes. Simultáneamente se monitoreo por intervalos de 30 minutos el pH externo y la cinética de actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ*. No se observó activación en la expresión del reportero *csrB-lacZ* en el medio que contiene el amortiguador. Así mismo, los valores de pH permanecieron constantes, alcanzando un pH máximo de 5.4 al final del crecimiento. Por el contrario, en el medio sin amortiguador, se observó durante el crecimiento inicial un ligero descenso en la expresión del reportero *csrB-lacZ*. Sin embargo la actividad del reportero se recobro cuando el pH externo alcanzó el valor de 5.6 ± 0.1 , aumentado constantemente hasta que el cultivo llego a la fase estacionaria. El pH externo aumentado progresivamente, alcanzando valores superiores a 8. (Figura 8).

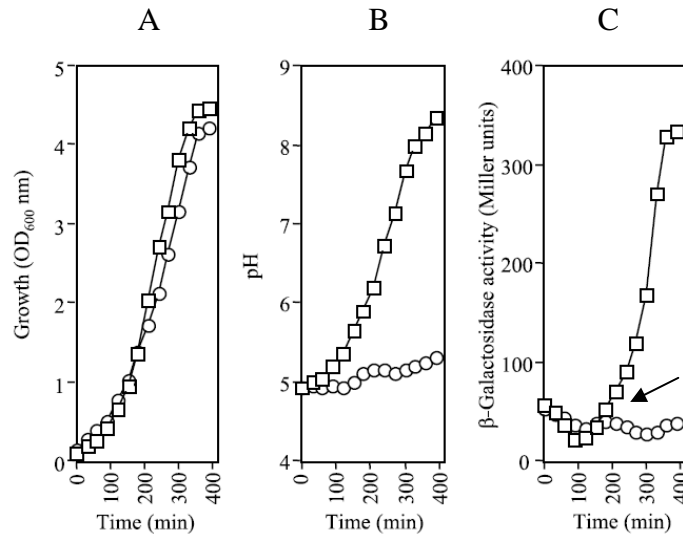


Figura 8. Efecto del pH externo en la activación del sistema BarA/UvrY. En el panel **A** se muestra el crecimiento en medio LB, en el panel **B** la determinación del pH externo y en el panel **C** la actividad β-galactosidasa producida por la fusión cromosómica transcripcional *csrB-lacZ* de la cepa silvestre KSB837. Las cinéticas representadas por ○ indican la presencia de un amortiguador en el medio de cultivo (0.1 M de HOMOPIPES pH 5.0), mientras que las cinéticas representadas por □ indican la ausencia del amortiguador. La flecha indica el punto de activación del sistema. Tomado de Mondragón, et al 2006.

Estos resultados indican que la activación del sistema BarA/UvrY es dependiente del pH externo, ya que en condiciones de crecimiento en donde se alcanzan valores de pH inferiores a 5.5 se crea un entorno ambiental que no permite la activación del sistema BarA/UvrY (78). Estos resultados proporcionan una base experimental para el diseño de futuros experimentos dirigidos hacia la búsqueda y caracterización del estímulo que percibe el sistema BarA/UvrY.

JUSTIFICACIÓN

Recientes estudios indican que una fracción extracelular obtenida a partir de cultivos en fase estacionaria de *Pseudomonas fluorescens* puede contener la señal para GacS. Dicho extracto tiene la capacidad de inducir moderadamente la activación del sistema GacS/GacA y sus genes blanco. Estos datos sugieren que GacS así como sus CS ortólogas pueden responder a una molécula extracelular que se produce o se acumula en la fase estacionaria, en donde la estabilidad o síntesis de dicha molécula, se ve afectada o bloqueada cuando las bacterias crecen en condiciones de pH externos bajos. Así mismo se ha demostrado que el sistema BarA/UvrY en *E. coli* desempeña un papel fundamental en la adaptación al ambiente, durante el cambio en la asimilación de diferentes fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas durante la transición a la fase estacionaria. En este sentido, se ha observado que cuando *E. coli* crece en un medio que contiene una sola fuente de carbono glucolítica, como es el caso de la glucosa, ésta se metaboliza por la vía de glucólisis durante la fase exponencial. Sin embargo, durante la fase estacionaria, la concentración de glucosa disminuye y es entonces cuando *E. coli* comienza a utilizar los productos derivados del catabolismo de la glucosa que se acumularon en el medio, tales como el acetato y alfa-ceto ácidos, entre otros. Alternativamente, cuando estos compuestos se han agotado, el metabolismo se basa en fuentes de carbono gluconeogénicas obtenidas a partir de bacterias lisadas y cuyo componente principal son los aminoácidos, que pronto constituirán una importante fuente de carbono para la síntesis de novo. Adicionalmente, se ha reportado que en *Pseudomonas fluorescens* el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ATC) tiene una influencia importante en la vía de señalización de GacS/GacA.

HIPÓTESIS

Basado en estos hechos, es posible que algún intermediario o producto metabólico acumulable, derivado del catabolismo de la glucosa o de los aminoácidos sea el responsable de activar al sistema BarA/UvrY.

OBJETIVOS

Objetivo general.

1.- Identificar el estímulo fisiológico que percibe el sistema de transducción de señales de dos componentes BarA/UvrY en *Escherichia coli*

Objetivos particulares.

1.- Explorar el efecto de la glucosa sobre la activación del sistema BarA/UvrY bajo condiciones no estimulantes (pH 5.0).

2.- Explorar el efecto de diferentes intermediarios o productos metabolitos acumulables derivados del catabolismo de la glucosa sobre la activación del sistema BarA/UvrY a pH 5.0

3.- Explorar el efecto de las mutaciones en las rutas del metabolismo central del carbono sobre la activación del sistema BarA/UvrY a pH 5.0

MÉTODOS

Tabla 2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
Tipo silvestre KSB837	CF7789 (<i>att-lom</i> :: <i>bla</i> (<i>csrB-lacZ</i>) ₁ (Hyb) Amp ^r	(40)
PA KSB837*	CF7789 (Δ <i>pta</i> :: <i>ackA</i>) Amp ^r Tet ^r	En este estudio
PAP KSB837*	CF7789 (Δ <i>pta</i> :: <i>ackA</i> - Δ <i>PoxB</i>) Amp ^r /Tet ^r /Cm ^r	En este estudio
HJT144	KSB837 (Δ <i>barA</i>) Amp ^r /Kan ^r	(106)
PA-BAKSB837*	CF7789 (Δ <i>barA</i> - Δ <i>pta</i> :: <i>ackA</i>) Amp ^r /Kan ^r /Tet ^r	En este estudio
HJT202	KSB837 (Δ <i>uvrY</i>) Amp ^r /Cm ^r	(106)
ECL5336	MC4100 (Δ <i>pta</i> :: <i>ackA</i>) Tet ^r	Donación Dr. Ohsuk Kwon (Japón)
PB11	JM101 (Δ <i>poxB</i>) Cm ^r	(Flores, et, al 2004) ^A
Bacteriófagos.		
P1 Vir	Fago estrictamente lítico.	

Las cepas marcadas con asterisco (*) se construyeron por transducción, utilizando el fago P1 como vehículo de transferencia de las mutaciones. Se utilizaron las cepas ECL5336 y PB11 como cepas donadoras de la mutación. **Flores, N., R. de Anda, S. Flores, A. Escalante, G. Hernandez, A. Martinez, O. T. Ramirez, G. Gosset, and F. Bolivar.** 2004. Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8:209-221.^A

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento y la actividad β -galactosidasa de la cepa silvestre y de las mutantes correspondientes, se recolectaron muestras del cultivo celular por 5 horas en intervalos de 30 min. Las muestras se obtuvieron a partir de un cultivo de 10 ml de medio LB (previamente diluido) suplementado con 0.1 M de *N-N'*-bis-2-ácido etanosulfónico (HOMOPIPES) para mantener el pH a 5.0 y 0.1 M de MOPS para mantener el pH a 7.0 en ensayos independientes. A partir de una D.O₆₀₀ de aproximadamente 0.1 se inocularon los matraces a pH 5.0 con diferentes soluciones de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, succinato, lactato y etanol, metil-acetato, metil-formato y etil-acetato en una concentración final de 6 mM. Para los ensayos con ácido benzoico, fenil-acetato y glucosa se

utilizó una concentración final de 1 mM, 1.5 mM y 0.2 %, respectivamente. Los cultivos se incubaron a temperatura (37° C) y agitación (250 rpm) constantes.

Determinación de la actividad β -galactosidasa

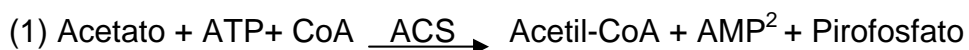
Para determinar la actividad β -galactosidasa se tomaron 100 μ l del cultivo celular recolectado y se depositaron en un tubo de ensaye que contenía 900 μ l de una mezcla de buffer de fosfatos, SDS (Dodecilsulfato de Sodio) al 0.1%, β -Mercaptoetanol y cloroformo. Para iniciar la reacción enzimática, se adicionaron 200 μ l de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactópiranosido) a una concentración de 4 mg/ml. Posteriormente se Incubaron los tubos a una temperatura de 30° C por 20 min. Finalmente se adicionaron 500 μ l de Na₂CO₃ 1M para detener la reacción. La determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó por duplicado, de acuerdo al protocolo descrito por Miller (73). La fórmula para calcular las Unidades Miller es:

$$\frac{\text{Abs } 420 \text{ nm} - (1.75 * \text{Abs } 550 \text{ nm})}{(T)(V)(D.O_{600 \text{ nm}})} = \text{Unidades Miller}$$

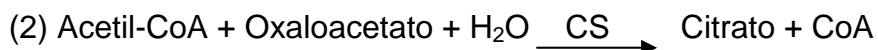
Donde la absorbancia a 420 nm es la medición del producto derivado de la reacción enzimática ONPG- β -galactosidasa. El producto numérico (1.75*Abs 550 nm) es un factor de corrección para la absorbancia de detritus celular a esta densidad óptica. T se refiere al tiempo de reacción (20 min), V al volumen en ml del cultivo de bacterias adicionado para cada reacción y DO 600 nm es la medición de la densidad óptica del cultivo, en el momento de la toma de la muestra.

Cuantificación del acetato extracelular.

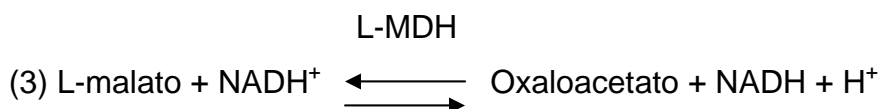
Para cuantificar la concentración de ácido acético extracelular se utilizó el kit R-Biopharm (Boehringer Mannheim). Este kit se basa en la formación de productos específicos a partir de tres reacciones enzimáticas acopladas.



Durante la primera reacción, la enzima acetil-CoA sintetasa (ACS) convierte el ácido acético (acetato) a acetil-CoA en presencia de ATP y CoA.



Durante la segunda reacción el acetil-CoA reacciona con el oxaloacetato para formar citrato y CoA en presencia de la enzima citrato sintasa (CS).



El oxaloacetato requerido para la reacción (2) se forma a partir de L-malato y NAD en presencia de L-malato deshidrogenasa (L-MDH). En esta reacción el NAD es reducido a NADH.

En general, la cuantificación del ácido acético se basa en la formación de NADH, determinado por el incremento en la absorbancia a 340 nm.

RESULTADOS

Parte I. Resultados publicados.

Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D (2010). **The physiological stimulus for the BarA sensor kinase.** J Bacteriol 192:2009–2012

Resumen

El sistema de transducción de señales de dos componentes (TCS) BarA/UvrY activa la transcripción de dos RNAs no codificantes CsrB y CsrC, los cuales actúan secuestrando a la proteína reguladora global de unión a RNA, llamada CsrA. En este estudio se demostró que los productos del metabolismo como formato y acetato son el estímulo fisiológico para el sistema BarA/UvrY, formado un vínculo con el sistema Csr para regular a nivel postranscripcional el estado metabólico de la célula.

Abstract

The two-component signal transduction system (TCS) BarA/UvrY activates transcription of CsrB and CsrC noncoding RNAs, which act by sequestering the RNA-binding global regulatory protein CsrA. Here, we show that the metabolic end products formate and acetate provide a physiological stimulus for this TCS and thus link posttranscriptional regulation by the Csr system to the metabolic state of the cell.

The Physiological Stimulus for the BarA Sensor Kinase[∇]

Ricardo Gonzalez Chavez,¹ Adrian F. Alvarez,¹ Tony Romeo,² and Dimitris Georgellis^{1*}

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México,¹ and Department of Microbiology and Cell Science, P.O. Box 110700, University of Florida, Gainesville, Florida 32611-0700²

Received 23 December 2009/Accepted 25 January 2010

The two-component signal transduction system (TCS) BarA/UvrY activates transcription of CsrB and CsrC noncoding RNAs, which act by sequestering the RNA-binding global regulatory protein CsrA. Here, we show that the metabolic end products formate and acetate provide a physiological stimulus for this TCS and thus link posttranscriptional regulation by the Csr system to the metabolic state of the cell.

The BarA/UvrY two-component signal transduction system (TCS) of *Escherichia coli* consists of the histidine sensor kinase BarA and its cognate response regulator UvrY (19). BarA (bacterial adaptive response) is a member of the subclass of tripartite sensor kinases (10, 17), whereas UvrY is a typical response regulator of the FixJ family (16). A key role of this TCS and its homologues in other Gram-negative bacteria, such as BarA/SirA of *Salmonella*, ExpS/ExpA of *Erwinia*, VarS/VarA of *Vibrio*, and GacS/GacA of *Pseudomonas* species, is to activate expression of noncoding RNAs, e.g., CsrB and CsrC in *E. coli* (13, 20, 29). These small regulatory RNAs possess repeated sequence elements that allow them to interact with multiple copies of the RNA binding protein CsrA and thus prevent its interaction with mRNA targets (1). Because CsrA somehow activates *csrB* and *csrC* expression via the BarA-UvrY TCS and thereby feedback inhibits its own activity in the cell, this regulatory circuitry appears to serve as a homeostatic device for fine-tuning CsrA activity (23, 24). In this model, BarA-UvrY is envisioned to provide a set point adjustment mechanism. Finally, deletion of the *barA* or *uvrY* gene affects CsrA activity, which regulates central and secondary carbon metabolism, biofilm development, motility, peptide uptake, *hfq* expression, and virulence gene expression in *E. coli* and other species (1–4, 6, 11, 18, 21, 26–28).

Despite the important roles played by the BarA/UvrY system, the physiological signals that regulate the activity of the BarA sensor kinase and thereby control the activity of the UvrY response regulator have not been identified for any of the orthologous TCSs. It has been suggested that BarA may respond to products or conditions of the host organism during an infection (31), as many of the target genes are involved in pathogenesis. However, this system is active in the absence of any host organism (18, 24). Moreover, a solvent-extractable extracellular fraction, capable of inducing a moderate activation of GacS/GacA-regulated targets, was isolated from stationary-phase cultures of *Pseudomonas fluorescens* and suggested to contain a signal for GacS (BarA) (9). In addition, tricarboxylic acid (TCA) cycle function was recently reported

to somehow influence GacS/GacA signaling (25). Here, we show that formate and acetate, but also other short-chain fatty acids, provide a physiological stimulus for the BarA sensor kinase.

Formate and acetate activate the BarA/UvrY two-component system. Previously, we demonstrated that a pH lower than 5.5 provides an environment that does not allow activation of the BarA/UvrY signaling pathway (15). However, in an exploratory experiment we observed that, despite the low pH, the presence of glucose in the growth medium leads to the activation of the BarA/UvrY TCS, as judged by the *csrB-lacZ* reporter expression (Fig. 1A). Curiously, activation of the system was observed approximately 2 h after addition of glucose (Fig. 1A), suggesting that glucose *per se* does not act as a direct stimulus. Therefore, we hypothesized that an end product of the glucose metabolism might be responsible for the activation of the BarA and/or UvrY protein. To test this hypothesis, the effects of physiological concentrations of succinate, acetate, ethanol, lactate, and formate on the activity of BarA/UvrY were examined. We observed that addition of succinate, ethanol, or lactate to the growth medium did not affect *csrB-lacZ* expression, whereas addition of formate and acetate resulted in an immediate activation of reporter expression (Fig. 1B). It has to be noted that addition of the weak acids formate and acetate to the growth medium led to a drastic decrease in growth rate of the cells (Fig. 1B). To find out whether the observed increase in reporter expression was due to the decrease in growth rate, benzoic acid was used to mimic the weak-acid-dependent growth inhibition. Although a strong growth rate inhibition was achieved by addition of benzoate to the growth medium, only a minor but significant increase of reporter expression was observed (Fig. 1C). Thus, it appears that formate and acetate provide a stimulatory signal for the BarA/UvrY TCS.

Formate activation requires the BarA sensor kinase, whereas acetate can act through UvrY alone. We wondered whether the above-mentioned carboxylic acids act directly on BarA and/or UvrY. To this end, the *csrB-lacZ* reporter was transduced into a $\Delta barA$ mutant strain and a $\Delta uvrY$ mutant strain (24) by P1vir transduction, and their levels of formate- and acetate-dependent reporter expression were monitored. Formate was not able to activate *csrB-lacZ* expression in either the $\Delta barA$ or the $\Delta uvrY$ mutant strain (Fig. 2A and B), indicating that formate acts through the BarA sensor kinase. On

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico. Phone: (52) 55 5622 5738. Fax: (52) 55 5622 5611. E-mail: dimitris@ifc.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 29 January 2010.

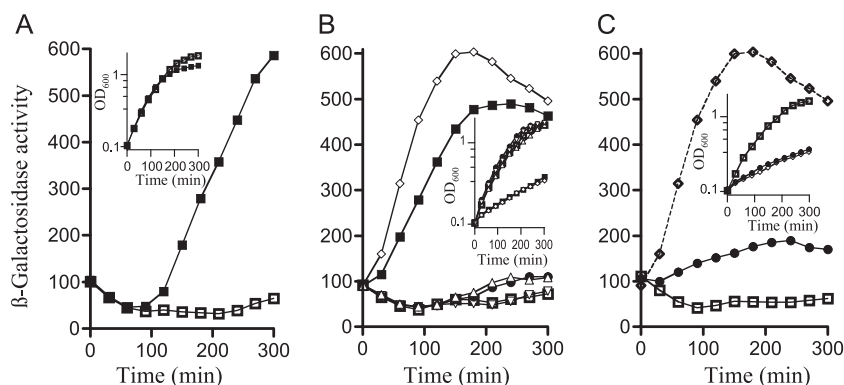


FIG. 1. Formate and acetate provide a stimulatory signal for the BarA/UvrY TCS. Overnight cultures of strain KSB837 (8), carrying the Φ (*csrB-lacZ*) transcriptional fusion, were diluted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of ~ 0.1 in LB medium, the pH of which had been adjusted and buffered to 5.0 by use of 0.1 M homopiperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (HOMOPIPES). The β -galactosidase activity expressed from the *csrB-lacZ* transcriptional fusion and the growth (insets) were followed for 300 min. (A) Growth and β -galactosidase activities of cells grown in LB medium, pH 5.0, in the absence (open squares) or presence (filled squares) of 0.2% glucose. (B) Growth and β -galactosidase activities of cells grown in the absence of stimulus (open squares) or in the presence of 6 mM formate (filled squares), 6 mM acetate (diamonds), 6 mM succinate (circles), 6 mM lactate (triangles), or 6 mM ethanol (inverted triangles). (C) Growth and β -galactosidase activities of cells grown in the absence of stimulus (open squares) or in the presence of 1 mM benzoate (circles) or 6 mM acetate (diamonds). The experiment was repeated three times in its entirety, with essentially identical results.

the other hand, acetate was able to activate reporter expression in the $\Delta barA$ mutant strain but not in the $\Delta uvrY$ strain (Fig. 2A and B), suggesting that acetate can act through UvrY. This is in agreement with a previous study (12) reporting that acetate activates SirA (UvrY) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium via the formation of acetyl phosphate (acetyl-P), a high-energy compound that can be used by SirA and many other response regulators (see reference 30 and references therein) to autophosphorylate. Indeed, inactivation of the acetyl-P synthetic pathways, by deletion of the acetate kinase (*ackA*) and phosphotransacetylase (*pta*) genes that reversibly convert acetate and acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) to acetyl-P (30), in the $\Delta barA$ mutant strain abolished the acetate-dependent activation of reporter expression (Fig. 2C). Thus, acetyl-P-dependent phosphorylation of UvrY appears to be, at least in part, responsible for the acetate effect on *csrB-lacZ* expression.

Nonetheless, the kinetics of acetate-dependent reporter expression were significantly slower in the $\Delta barA$ mutant strain than in the wild-type strain (Fig. 2B). We therefore considered that acetate might also act through BarA. This was tested by examining the effect of acetate on the expression of *csrB-lacZ* in the *ackA pta* mutant strain. In this strain, acetate addition to the growth medium resulted in the immediate activation of reporter expression (Fig. 2D), although with a loss of amplitude. Thus, acetate, like formate, can also act through BarA.

Extracellular acetate accumulates concomitantly with the onset of *csrB-lacZ* expression. Considering that *csrB-lacZ* expression is activated in cells grown at pH 7.0 or at pH 5.0 in the presence of glucose, but not at pH 5.0 in the absence of glucose (Fig. 3A), and assuming that acetate may act as a direct stimulus for the BarA/UvrY TCS, we reasoned that acetate and/or formate should accumulate only under the former conditions. To explore this possibility, we determined the extracellular concentrations of formate and acetate in aerobic cultures grown at pH 7.0 and at pH 5.0 with or without glucose. Formate was not detected under these growth conditions (data not

shown), consistent with its preferential accumulation under anaerobic conditions (22). On the other hand, acetate accumulated in the cultures that were grown at pH 7.0 or pH 5.0 with glucose, reaching a maximum of ~ 6 mM or 9 mM, respectively, but did not accumulate at pH 5.0 in the absence of glucose (Fig. 3B). To distinguish between the possible acetyl-P-dependent UvrY activation and acetate-dependent BarA activation, we examined the effect of glucose on *csrB-lacZ* expression in the acetyl-P-defective *ackA pta* mutant strain. In this case, activation of reporter expression still occurred (Fig. 3A). Also, the concentration of extracellular acetate was found to increase with time, reaching a maximum of ~ 7 mM (Fig. 3B). Because acetate synthesis relies on the *ackA pta* gene products, which reversibly convert acetyl-CoA to acetate, but also on pyruvate oxidase (*poxB*), which converts pyruvate to acetate (5), we generated an *ackA pta poxB* triple mutant strain and tested the effect of glucose on reporter expression and acetate production. In this case, activation of reporter expression failed to occur (Fig. 3A) and there was no significant increase in the extracellular concentration of acetate (Fig. 3B). Thus, the onset of reporter expression was strictly correlated with the increase in the extracellular concentration of acetate.

Carboxylic acid moiety is essential for BarA activation. To find out whether the carboxylate group is essential for BarA activation, we tested the effects of various molecules with structures similar to that of formate or acetate on the activation of *csrB-lacZ* expression. Esterified derivatives, such as methyl formate, methyl acetate, and ethyl acetate, failed to activate reporter expression (Fig. 4A). On the other hand, phenylacetic acid, a compound containing an aromatic ring at the aliphatic tail of acetate, activated reporter expression. The lower degree of activation achieved by phenylacetate than by acetate and formate might be due to effects of the bulky phenyl ring on binding to BarA, although this remains to be determined.

The carboxylate group is shared by formate, acetate, and other short-chain fatty acids, including propionate, butyrate, valerate, and caproate, which possess unbranched aliphatic

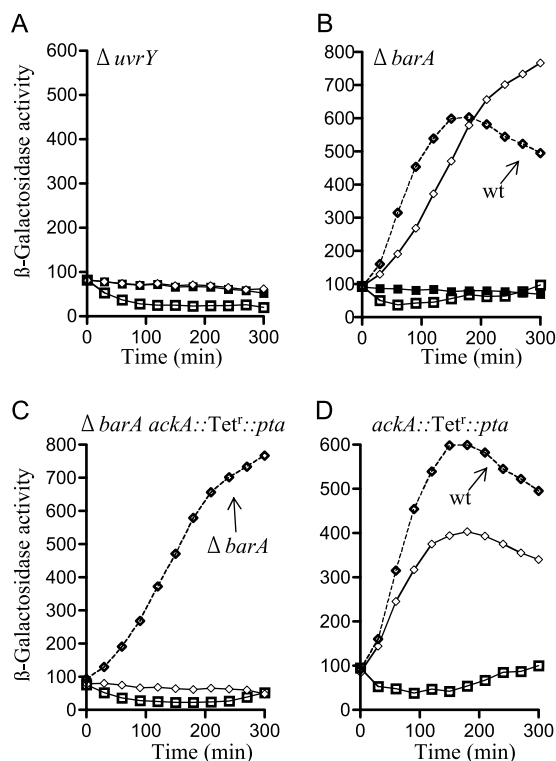


FIG. 2. Formate acts through BarA-UvrY, whereas acetate can act through UvrY alone in a strain that is wild type for *ack* and *pta* genes. Overnight cultures of *uvrY::Cm^r* (A), *barA::Kan^r* (B), *barA::Kan^r* and *ackA::Tet^r::pta* (C), and *ackA::Tet^r::pta* (D) strains (24), all carrying the Φ (*csrB-lacZ*) transcriptional fusion, were grown in buffered LB medium at pH 5.0, as described in the legend for Fig. 1. The *ackA::Tet^r::pta* strains were constructed by P1vir transduction of the deleted genes from strain ECL5336 (14). The β -galactosidase activity expressed from the *csrB-lacZ* transcriptional fusion in the respective strain grown in the absence of stimulus (open squares) or in the presence of 6 mM formate (filled squares) or 6 mM acetate (diamonds) is presented. To facilitate comparisons, the β -galactosidase activity during growth of the wild-type (wt) strain with acetate is included in panels B and D, and the β -galactosidase activity during growth of the *barA::Kan^r* strain with acetate is included in panel C (diamonds, dashed lines). The averages from four independent experiments are presented (standard deviations were less than 5% from the means).

tails of various lengths (3 to 6 carbons). Therefore, we asked whether these short-chain fatty acids were also able to activate the BarA/UvrY TCS. Indeed, addition of any of these compounds to the growth medium resulted in the immediate activation of the BarA/UvrY signaling cascade (Fig. 4B). Moreover, the effect of these compounds on the expression of *csrB-lacZ* was eliminated in a Δ *barA* mutant strain (Fig. 4B), implying that they all act through the BarA sensor kinase. It is noteworthy that the level of reporter expression was inversely proportional with the length of the aliphatic tail.

Conclusions. Our findings demonstrate that aliphatic carboxylic acids, such as formate, acetate, propionate, and others, provide a physiological stimulus for the BarA sensor kinase of the BarA-UvrY TCS of *Escherichia coli*. This activity did not require acetyl-P formation, although acetyl-P may activate signaling of this TCS through the response regulator UvrY. The rapid response to the stimuli and the fact that these com-

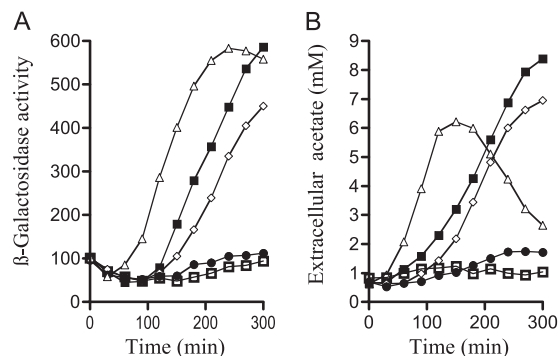


FIG. 3. Concentrations of extracellular acetate during growth under BarA-UvrY stimulating and nonstimulating conditions. The *csrB-lacZ*-bearing wild-type, *ackA::Tet^r::pta* mutant, and *ackA::Tet^r::pta poxB::Cm^r* mutant strains were grown in buffered LB medium at pH 5.0, as described in the legend for Fig. 1. Glucose was added at 0.2% (wt/vol). The *poxB::Cm^r* strain was constructed by P1vir transduction of the deleted gene from strain JM101*poxB* (7). Samples were withdrawn at the indicated times, and the β -galactosidase activity (A) and concentration of extracellular acetate (B) were determined. The concentration of acetate was determined using an R-Biopharm acetic acid determination kit (Boehringer Mannheim). Results are shown for the wild type grown in LB at pH 5.0 (open squares), the wild type grown in LB at pH 5.0 supplemented with glucose (filled squares), the *ackA::Tet^r::pta* mutant grown in LB at pH 5.0 with glucose (diamonds), the *ackA::Tet^r::pta poxB::Cm^r* mutant grown in LB at pH 5.0 with glucose (circles), and the wild type grown in LB at pH 7.0 (triangles). The averages from four independent experiments are presented (standard deviations were less than 5% from the means).

pounds are not readily converted to any common intermediary metabolite suggest that their related chemical structures permit them to signal directly to BarA, although this conclusion requires biochemical studies with the purified protein.

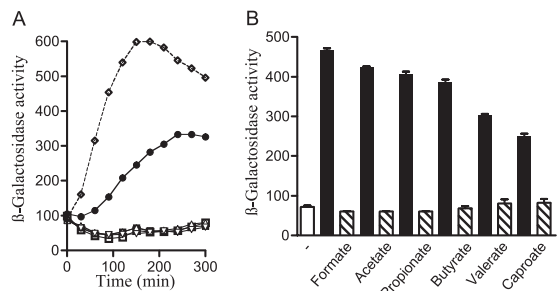


FIG. 4. The carboxyl group of straight-chained carboxylic acids is essential for BarA activation. The wild-type strain was grown in buffered LB medium at pH 5.0, as described in the legend for Fig. 1. (A) The levels of β -galactosidase activity expressed from the *csrB-lacZ* transcriptional fusion in the absence of stimulus (open squares) or in the presence of 6 mM methyl formate (filled squares), 6 mM methyl acetate (triangles), 6 mM ethyl acetate (inverted triangles), or 1.5 mM phenyl acetate (circles) are presented. The maximum phenyl acetate-dependent reporter expression was obtained at 1.5 to 2.0 mM phenyl acetate. To facilitate comparisons, the β -galactosidase activity from growth in LB supplemented with 6 mM acetate is included (diamonds, dashed line). (B) Levels of β -galactosidase activity expressed from the *csrB-lacZ* transcriptional fusion in the wild-type strain in the absence of stimulus (open bar) or in the presence of various carboxylic acids (filled bars) or in the *barA::Kan^r ackA::Tet^r::pta* mutant strain (striped bars). The *ackA::Tet^r::pta* mutation was used in order to avoid acetyl-P-dependent phosphorylation of UvrY. The averages from four independent experiments are presented (standard deviations were less than 5% from the means).

Whether BarA homologs of other species also signal via carboxylic acids is not yet clear, although this scenario is compatible with the finding that the status of the TCA cycle somehow influences GacS signaling in pseudomonads (25).

As mentioned earlier, CsrA indirectly activates transcription of its RNA antagonists CsrB and CsrC via the BarA-UvrY TCS. Furthermore, CsrA activates glycolysis through the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway, a major source of acetate (21). Thus, our present findings appear to bridge the gap in our understanding of this circuitry and imply that CsrA alters carbon flux into the physiological activator of the BarA sensor kinase (23, 24, 29).

Acetate is a predominant metabolite of *E. coli* and the most abundant fatty acid in the intestinal environment of this bacterium, where levels can reach severalfold higher than those that were required for the BarA signaling reaction (12). Acetate tends to accumulate in growth media near the transition to stationary phase, as the cells expend glucose or other acetogenic substrates, and is thereafter assimilated via the acetyl-CoA synthetase reaction (30). This shift from acetate dissimilation to assimilation is sometimes referred to as the acetate switch. Its effect on acetyl-P levels and thus autophosphorylation of a variety of bacterial TCSs has been proposed to influence numerous cellular functions (30). Our present findings imply an additional broad signaling role for acetate, as BarA/UvrY and the Csr system have far-reaching regulatory effects on bacterial physiology, metabolism, and virulence.

We thank Claudia Rodriguez for technical assistance, F. Bolivar for the *poxB::Cm^r* mutant, and A. Gómez Puyou for helpful discussions.

This work was supported by grants 37342-N from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); IN221106/17 from DGAPA-PAPIIT, UNAM; CRP/MEX08-02 from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB); R01 GM059969 from the National Institutes of Health; and FLA-MCS-004949 from the University of Florida CRIS project.

REFERENCES

- Babitzke, P., and T. Romeo. 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:156–163.
- Baker, C. S., L. A. Eory, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo, and P. Babitzke. 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* *hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.* **189**:5472–5481.
- Baker, C. S., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo, and P. Babitzke. 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**:1599–1610.
- Bhatt, S., A. N. Edwards, H. T. Nguyen, D. Merlin, T. Romeo, and D. Kalman. 2009. The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**:3552–3568.
- Dittrich, C. R., G. N. Bennett, and K. Y. San. 2005. Characterization of the acetate-producing pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **21**:1062–1067.
- Dubey, A. K., C. S. Baker, K. Suzuki, A. D. Jones, P. Pandit, T. Romeo, and P. Babitzke. 2003. CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J. Bacteriol.* **185**:4450–4460.
- Flores, N., R. de Anda, S. Flores, A. Escalante, G. Hernandez, A. Martinez, O. T. Ramirez, G. Gosset, and F. Bolivar. 2004. Role of pyruvate oxidase in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **8**:209–221.
- 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.
- 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.
- Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno. 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* **13**:5195–5202.
- Jonas, K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Romling, and O. Melefors. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* **70**:236–257.
- Lawhon, S. D., R. Maurer, M. Suyemoto, and C. Altier. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* **46**:1451–1464.
- Lenz, D. H., M. B. Miller, J. Zhu, R. V. Kulkarni, and B. L. Bassler. 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **58**:1186–1202.
- Liu, X., G. R. Pena Sandoval, B. L. Wanner, W. S. Jung, D. Georgellis, and O. Kwon. 2009. Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **47**:657–662.
- Mondragon, V., B. Franco, K. Jonas, K. Suzuki, T. Romeo, O. Melefors, and D. Georgellis. 2006. pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:8303–8306.
- Moolenaar, G. F., C. A. van Sluis, C. Backendorf, and 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**:4273–4289.
- 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.
- Pernestig, A. K., D. Georgellis, T. Romeo, K. Suzuki, H. Tomenius, S. Normark, and O. Melefors. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* **185**:843–853.
- Pernestig, A. K., 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.
- Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**:1321–1330.
- Sabnis, N. A., H. Yang, and T. Romeo. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* **270**:29096–29104.
- Sawers, G. 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**:57–88.
- Suzuki, K., P. Babitzke, S. R. Kushner, and 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.* **20**:2605–2617.
- Suzuki, K., X. Wang, T. Weilbacher, A. K. Pernestig, O. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:5130–5140.
- Takeuchi, K., P. Kiefer, C. Reimann, C. Keel, C. Dubuis, J. Rolli, J. A. Vorholt, and D. Haas. 2009. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **284**:34976–34985.
- Tomenius, H., A. K. Pernestig, K. Jonas, D. Georgellis, R. Mollby, S. Normark, and O. Melefors. 2006. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is a virulence determinant in the urinary tract. *BMC Microbiol.* **6**:27.
- Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. 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.
- Wei, B. L., A. M. Brun-Zinkernagel, J. W. Simecka, B. M. Pruss, P. Babitzke, and T. Romeo. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**:245–256.
- Weilbacher, T., K. Suzuki, A. K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**:657–670.
- Wolfe, A. J. 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:12–50.
- Zhang, J. P., and S. Normark. 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* **273**:1234–1236.

Parte II. Resultados no publicados.

A. La forma permeable de los ácidos carboxílicos activa al sistema BarA/UvrY.

De acuerdo con los resultados anteriores, se demostró que el grupo carboxilato de los ácidos carboxílicos de cadena corta es esencial para la activación del sistema BarA/UvrY. Sin embargo, se conoce que estos ácidos débiles pueden estructurarse en dos conformaciones diferentes, dependiendo de sus propiedades ácido-base. La forma ácida ó no disociada (R-COOH) en la cual es capaz de ceder protones y la forma básica ó disociada (R-COO⁻), en la cual es capaz de aceptar protones. En su forma no disociada estos ácidos tienen la capacidad de permear las membranas celulares acoplado a un gradiente de pH transmembranal. En su forma básica estos ácidos no tienen esta propiedad. Una vez que pasan la membrana, estos ácidos se disocian en un protón y en un anión. El protón acidifica el citoplasma, mientras que el anión aumenta la presión osmótica interna (120). Sin embargo, cada una de estas formas se puede presentar en mayor o menor concentración dependiendo del pH y pKa, variables que pueden agruparse en la ecuación de Henderson-Hasselbach: $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{base}]}{[\text{ácido}]} \right)$. Esta ecuación indica que el pKa de un ácido es numéricamente igual al pH de una disolución cuando las concentraciones molares del ácido y de su base conjugada son iguales.

En este sentido, existe la posibilidad de que la forma permeable y/o la forma no permeable de estos ácidos carboxílicos puedan activar al sistema. Para conocer cual de estas dos formas iónicas es capaz de activar a BarA, se determinó en la cepa silvestre la actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* en presencia de diferentes concentraciones de formato de sodio, utilizando medio LB ajustado a diferentes valores de pH (7.0,6.5,6.0,5.5 y 5.0). También se obtuvo la fracción de ácido fórmico y del ión formato a partir de una concentración total de formato, utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach. Finalmente se correlacionó la concentración de estas dos fracciones con la actividad β -galactosidasa obtenida a los 60 y a los 90 min posteriores a la adición del formato de sodio.

La línea de tendencia obtenida a partir del análisis estadístico de la dispersión de datos de la fracción no disociada refleja un correlación positiva de tipo sigmoideal entre la concentración de ácido fórmico y la expresión del reportero *csrB-lacZ* obtenida a los 60 y 90 min (Figura 9AB). Los coeficientes de determinación (R^2) de 0.85 y 0.83, respectivamente), indican que más del 80 % de los datos se encuentran representados por este modelo. Es importante mencionar que en el caso de la fracción disociada no fue posible obtener un patrón de correlación con respecto a la actividad del reportero. Por lo tanto, el resultado de este análisis indica que la forma ácida, no disociada del formato es la que activa al sistema BarA/UvrY.

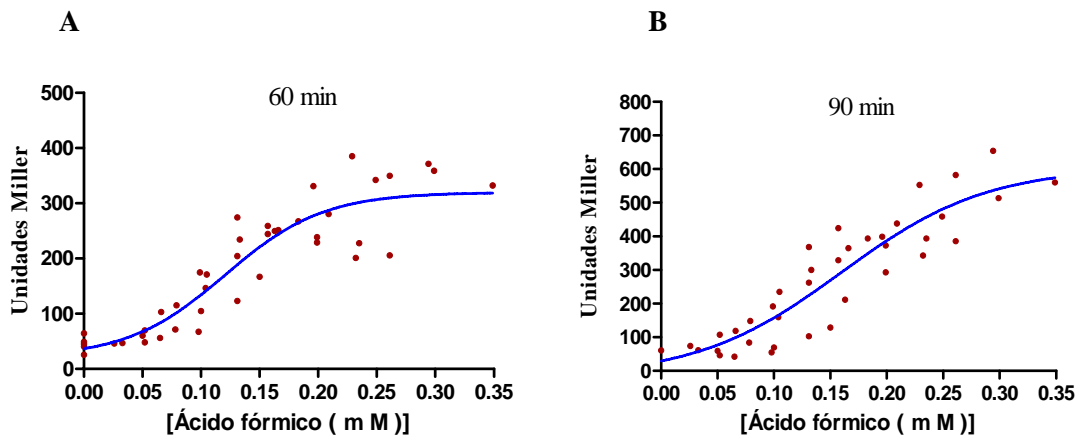


Figura 9. Expresión del reportero *csrB-lacZ* en función de la concentración del ácido fórmico. Se observa en **A** y en **B** una correlación positiva de tipo sigmoideal entre la expresión del reportero *csrB-lacZ* a los 60 y 90 min y la concentración de ácido fórmico. Los coeficientes de determinación (R^2) de 0.85 (**A**) y 0.83 (**B**) indican que más del 80 % de los datos se encuentran representados por este modelo.

B. Región común de BarA en el reconocimiento del estímulo.

De acuerdo con los resultados anteriores, se demostró que el grupo carboxilato de los ácidos carboxílicos de cadena corta es esencial para la activación del sistema BarA/UvrY. Basado en la estructura química de estos ácidos, se sugiere que éstos pueden interactuar con BarA. Para comprobar dicha hipótesis se realizaron ensayos de competencias en la cepa $\Delta pta-ackA$ utilizando ácido acético y ácido cloroacético. Estas moléculas activan al sistema en diferentes

grados, sin embargo comparten en común un grupo carboxilo. Como ensayo control, se determinó la expresión del reportero *csrB-lacZ* y el crecimiento celular por intervalos de 30 min a partir de cultivos independientes que contenían 10 ml de medio LB pH 5.0 suplementados con 5 mM de ácido acético, 1.25 mM de ácido cloroacético y sin suplemento, respectivamente. Posteriormente en los ensayos prueba se adicionó 1.25 mM de ácido cloroacético al inicio del cultivo y 30 min después se adicionó al mismo cultivo 5 mM de ácido acético. Finalmente, en ensayos opuestos se adicionó 5 mM ácido acético al inicio del cultivo y 30 min después se adicionó al mismo cultivo 1.25 mM de ácido cloroacético (Figura 10AB).

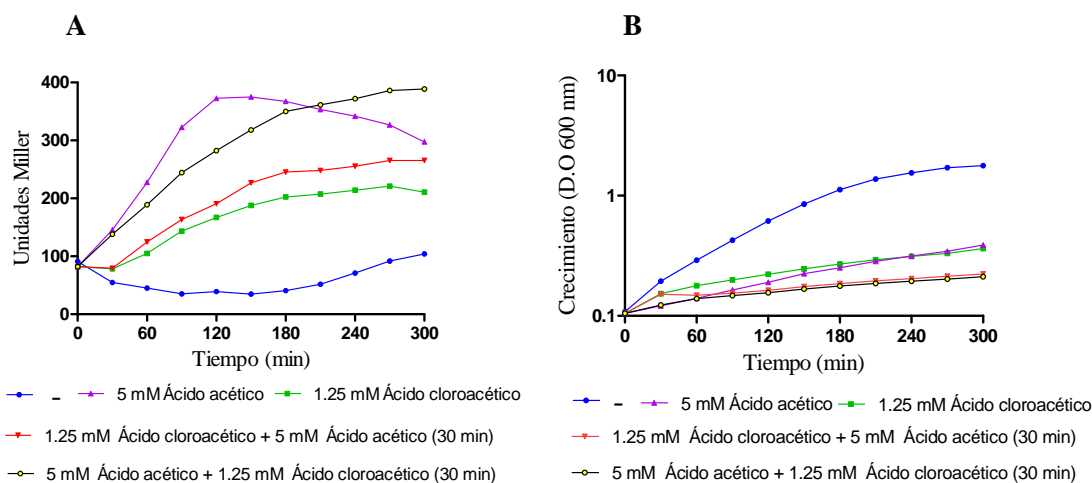


Figura 10. Ensayos de competencia entre el ácido acético y el ácido cloroacético por BarA. En la figura se muestra por intervalos de 30 min, la expresión del reportero *csrB-lacZ* (A) y el crecimiento celular (B) de la cepa mutante ($\Delta pta-ackA$) en presencia de 5 mM de ácido acético, 1.25 mM de ácido cloroacético, y la combinación de ambas moléculas.

En los ensayos control se observó una mayor activación del sistema BarA/UvrY en presencia de 5 mM de ácido acético y una menor activación del sistema en presencia de 1.25 mM de ácido cloroacético. La tasa de crecimiento celular disminuyó de forma similar en ambos casos, si se compara con el cultivo que no contiene ninguna molécula activadora. Por el contrario, en los ensayos prueba no se observó un aumento significativo en la expresión del reportero cuando se adicionó el ácido acético al cultivo celular que contenía inicialmente el ácido cloroacético. Sin embargo, al adicionar el ácido cloroacético al cultivo que contenía inicialmente el ácido acético, se observó una disminución en la

pendiente de activación (Figura 9A). La tasa de crecimiento disminuyó de forma similar en ambos casos (Figura 9B). El resultado de este experimento indica que cuando ambas moléculas activadoras se encuentran presentes en el medio, estas tienen la capacidad de competir entre sí por el sitio activo de BarA, sugiriendo la existencia de una región en común para el reconocimiento del estímulo.

C. Activación del sistema BarA/UvrY en condiciones alcalinas (pH 7.0).

De acuerdo con resultados anteriores se ha observado que en una cepa silvestre WT que crece en medio LB suplementado con 0.2 % de glucosa y bajo condiciones aeróbicas y alcalinas (pH 7.0) el sistema BarA/UvrY se encuentra activo debido a la presencia de acetato. Sin embargo, al determinar la actividad del reportero *csrB-lacZ* en una cepa mutante (Δ *pta-ackA-poxB*) que no produce acetato, el sistema aún se encuentra activo. Además se observó dos niveles de activación. Uno se presenta durante la fase exponencial (60 min) y el otro se presenta durante la fase estacionaria (240 min) (Figura 11A). Estos resultados indican que el acetato en estas condiciones no es el responsable de activar al sistema BarA/UvrY.

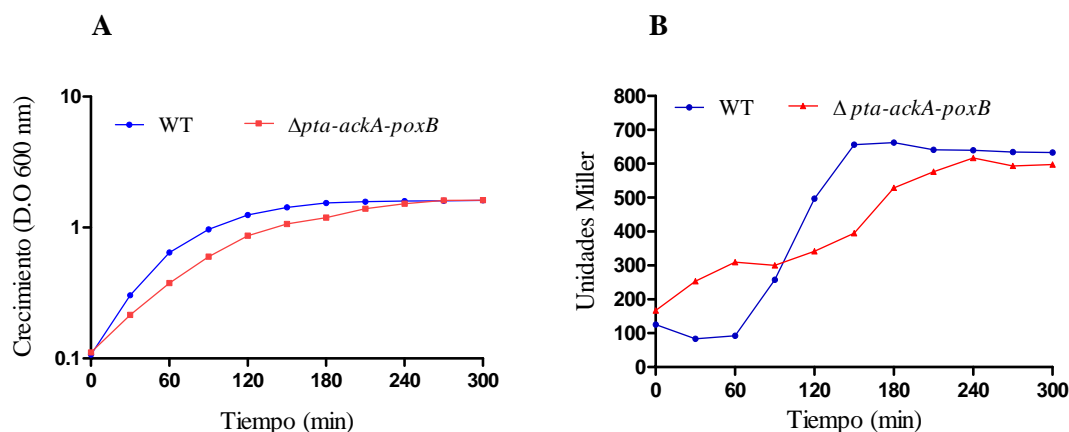


Figura 11. Crecimiento celular (A) y actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* (B) en la cepa silvestre (WT) y en la cepas mutante Δ *pta-ackA-poxB* en medio LB pH 7.0 suplementado con 0.2 % de glucosa.

Estos datos pueden ser contradictorios. Sin embargo, recientes estudios indican que en *Pseudomonas fluorescens* la expresión de RNAs pequeños (rsmYZ, homólogos de csrB y csrC respectivamente) es controlada por intermediarios del ciclo de Krebs tales como 2-oxoglutarato, succinato y fumarato. Dicha expresión es dependiente de la cinasa sensora GacS, homólogo de BarA. De acuerdo con estos antecedentes, es posible que intermediarios del ciclo de Krebs o derivados de estos, actúen como precursores para la síntesis de otros ácidos carboxílicos, tales como propionato, butirato, valerato y caproato que puedan activar al sistema BarA/UvrY en estas condiciones de crecimiento. Para comprobar esta hipótesis, se determinó la expresión del reportero *csrB-lacZ* en cepas mutantes que carecen de una de las subunidades del complejo piruvato deshidrogenasa ($\Delta aceE$).

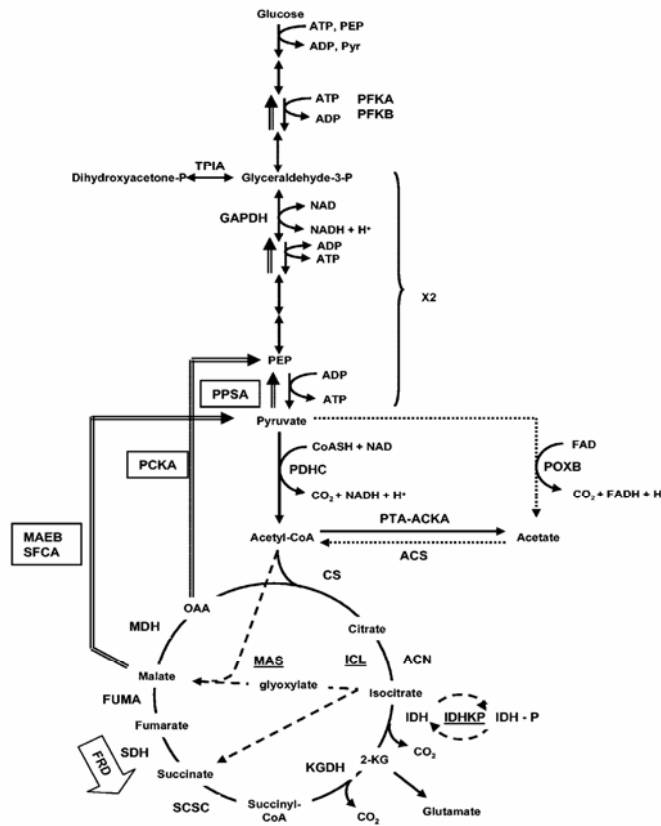


Figura 12. Metabolismo central del carbono. En la figura se observa las principales rutas metabólicas cuando *E. coli* crece en presencia de glucosa como fuente de carbono.

Este complejo enzimático (PDHC) produce acetil-CoA a partir de piruvato. Esta reacción se considera un punto regulador en el metabolismo central del carbono, por lo que al ser eliminado disminuye considerablemente el flujo de carbono hacia el ciclo de Krebs (Figura 12). De acuerdo con estos experimentos, la expresión del reportero *csrB-lacZ* en la cepa mutante ($\Delta aceE$) se observó disminuida en un 50%, si se compara con la expresión obtenida en la cepa silvestre (Figura 13B). Estos resultados indican que el acetil-CoA participa de forma importante en la activación del sistema BarA/UvrY independientemente de la acción del acetato o acetil-P.

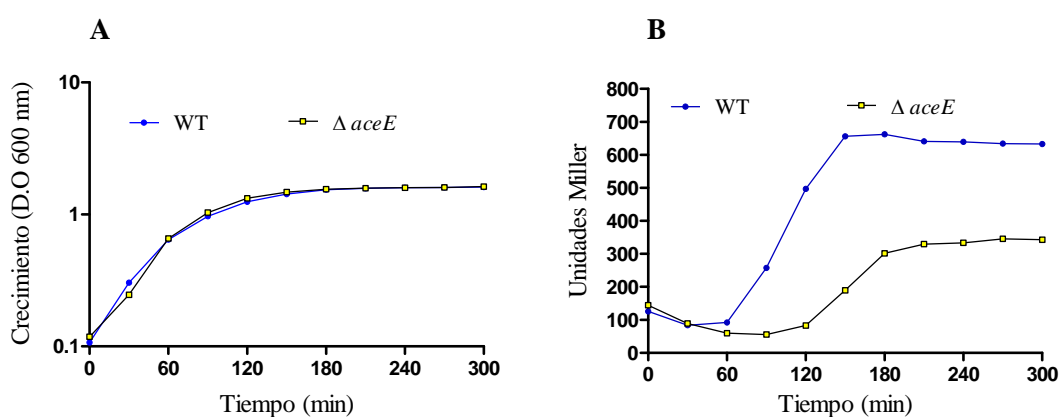


Figura 13. Crecimiento celular (A) y actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* (B) en la cepa silvestre (WT) y en la cepa mutante $\Delta aceE$ que crecen en medio LB suplementado con 0.2 % de glucosa a pH 7.0.

Para verificar estos resultados se determinó durante 8 horas la actividad del reportero *csrB-lacZ* en la cepa silvestre y en la cepa mutante que no produce acetato ($\Delta pta-ackA-poxB$), utilizando como medio de propagación, medio mínimo M9 pH 7.0 suplementado con 0.5% de glucosa como única fuente de carbono. Así mismo, se determinó la actividad del reportero en la cepa que carece de una de las subunidades del complejo citrato sintasa ($\Delta gltA$). Este complejo enzimático se caracteriza por llevar a cabo la primera reacción del ciclo de Krebs produciendo citrato a partir de acetil-CoA y oxaloacetato.

De acuerdo con los ensayos realizados en la cepa mutante $\Delta pta-ackA-poxB$ la expresión del reportero *csrB-lacZ* fue similar a la obtenida en la cepa silvestre, la cual se llevó a cabo de forma inmediata y durante la fase exponencial (Figura

14AB). Estos resultados indican que bajo estas condiciones de crecimiento, el acetato no tienen un efecto sobre la activación del sistema BarA/UvrY. Por el contrario, al determinar la actividad del reportero en la cepa mutante $\Delta gltA$ se observó una disminución significativa en la expresión de *csrB-lacZ* con respecto a la obtenida en la cepa silvestre. Nuevamente, estos resultados indican que algún producto intermediario o derivado del ciclo de Krebs tiene un efecto sobre la activación del sistema BarA/UvrY (Figura 14AB). Incluso es posible especular acerca de otras posibles rutas para la producción de ácido carboxílicos. En este sentido, se han descubierto nuevas enzimas en *E. coli* que pueden catalizar la conversión de succinato a propionato. Una de estas enzimas es YgfH (Propionil CoA:Succinato CoA tranferasa) (Haller T., et al 2000).

Para determinar si esta activación del sistema es a través de BarA o de UvrY se determinó la actividad del reportero en la cepa mutante $\Delta barA$, en donde se observó una disminución significativa en la expresión del reportero, lo que indica que el acetyl-P no tiene un efecto sobre UvrY. En general, estos resultados indican que en estas condiciones de crecimiento la vía del acetyl-P-acetato no tiene un efecto sobre la expresión del reportero *csrB-lacZ*, por lo tanto la activación del sistema es únicamente a través de BarA (Figura 14AB).

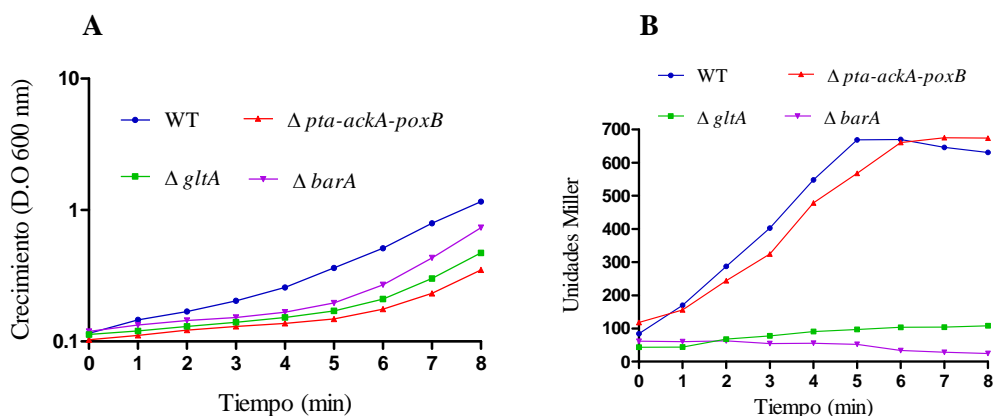


Figura 14. Crecimiento celular (A) y actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* (B) en la cepa silvestre (WT) y en las cepas mutantes $\Delta pta-ackA-poxB$, $\Delta gltA$ y $\Delta barA$ que crecen en medio mínimo M9 pH 7.0 suplementado con 0.5% de glucosa como única fuente de carbono.

D. Mecanismo de regulación del sistema BarA/UvrY dependiente de CsrA.

Como se ha descrito anteriormente (p.22) CsrA es una proteína de unión a RNA. Sin embargo en su estado libre puede interactuar con diferentes RNAs mensajeros para regular positiva o negativamente la expresión genética a nivel postranscripcional. De acuerdo con los datos de Suzuki y colaboradores (103) en una cepa mutante $\Delta csrA$ que crecen en medio LB no se expresa *csrB* (Figura 15).

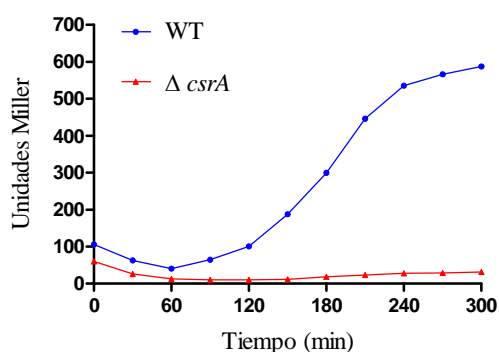


Figura 15. Actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* en la cepa silvestre (WT) y en la cepa mutante $\Delta csrA$. Ambas cepas crecen medio LB pH 7.0

De acuerdo con estos datos se sugiere la posibilidad de que CsrA controle la expresión de BarA y/o UvrY. Para comprobar esta hipótesis se determinó la actividad del reportero *csrB-lacZ* en la cepa mutante $\Delta csrA$ complementada con los plásmidos pBA29 y pUY14 que expresan a BarA y UvrY, respectivamente. Estos ensayos se realizaron en medio LB pH 7.0 y pH 5.0. Estos últimos en presencia de 6 mM de formato, acetato y 0.2% de glucosa. Al determinar la actividad β -galactosidasa de la cepa $\Delta csrA$ (pBA29) no se obtuvo expresión del reportero en ninguna condición de activación (Figura 16).

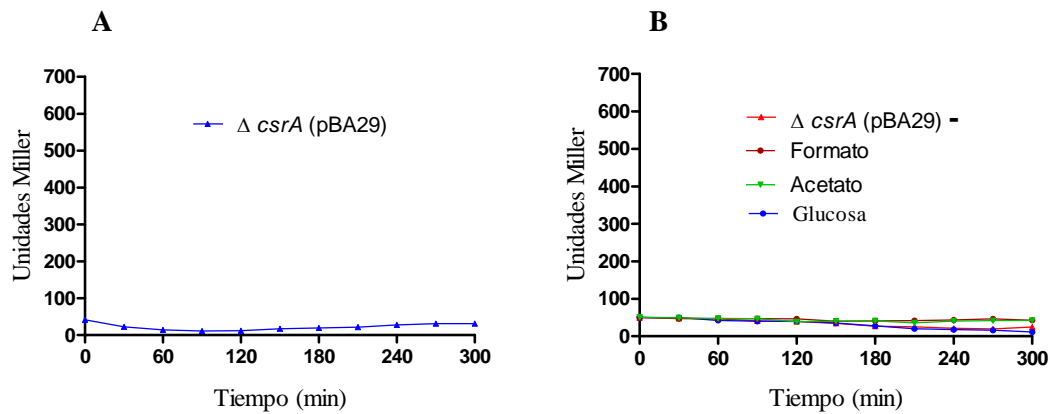


Figura 16. Actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* en la cepa mutante $\Delta csrA$ complementada con el plásmido que expresa a BarA (pBA29). Estas cepas crecen en medio LB pH 7.0 (A) y LB pH 5.0 en presencia de 6 m M de formato, acetato y 0.2% de glucosa (B).

Por el contrario, al determinar la actividad del reportero en la cepa $\Delta csrA$ (pUY14) que crece a pH 7.0, la actividad del reportero *csrB-lacZ* se recobró de forma similar a la obtenida en la cepa silvestre (Figura 17A). Sin embargo a pH 5.0 únicamente en presencia de acetato exógeno se observó actividad del reportero, mientras que en presencia de formato (ácido carboxílico que únicamente actúa a través de BarA) y de glucosa no se obtuvo actividad del reportero (Figura 17B). Este resultado es consistente con el hecho de que a pH 5.0 *uvrY* se activa en presencia de acetato, vía la formación de acetil-P e independiente de la acción de BarA. También es consistente con el hecho de que *csrA* controla positivamente a nivel postranscripcional la vía de glucólisis. Estos resultados indican que CsrA es necesario para la expresión de BarA y/o UvrY. Dando la pauta para futuros experimentos dirigidos hacia la búsqueda y caracterización del mecanismo de regulación del sistema BarA/UvrY dependiente de CsrA.

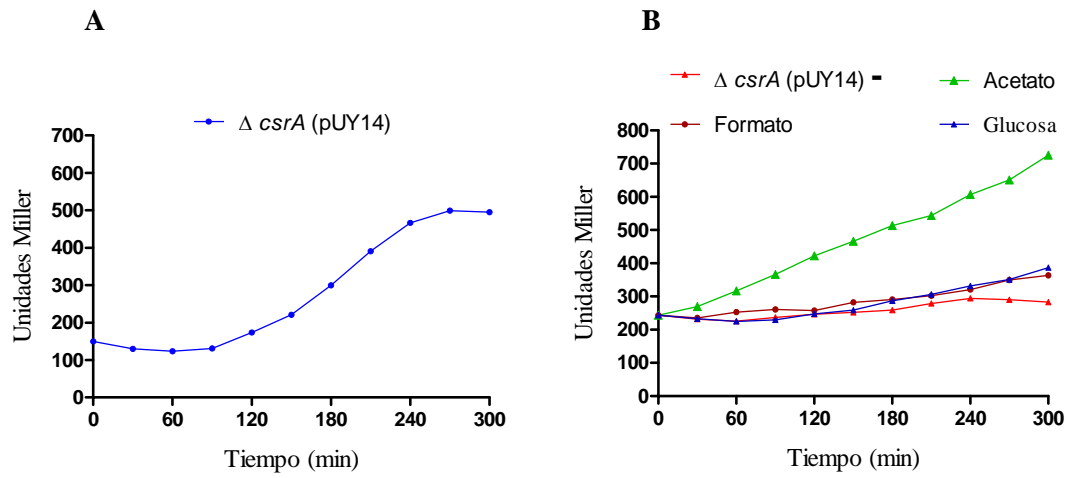


Figura 17. Actividad β -galactosidasa producida por el reportero *csrB-lacZ* en la cepa mutante $\Delta csrA$ complementada con el plásmido que expresa a UvrY (pUY14). Estas cepas crecen en medio LB pH 7.0 (**A**) y LB pH 5.0 en presencia de 6 m M de formato, acetato y 0.2% de glucosa (**B**).

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo fetal el ambiente en el útero de los mamíferos es estéril. Sin embargo durante y después del nacimiento, el colon del recién nacido humano queda expuesto y es colonizado rápidamente por un gran número de organismos bacterianos, tales como *E. coli* y *Enterococcus*. Este proceso de colonización acelerado es debido a que diferentes bacterias facultativas metabolizan la lactosa presente en la leche materna produciendo acetato y otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC) también conocidos como ácidos grasos volátiles. Durante este proceso se crea un ambiente ácido favorable para la colonización de otros organismos anaerobios acidófilos, los cuales compiten entre si por los nutrientes limitantes y nichos específicos causando la diversificación de la microbiota en el colon. La flora bacteriana en el colon de un humano adulto consiste en más de 50 géneros y 400 especies, por lo general asociadas en forma de biopelículas a las partículas de material intestinal, embebidas en la mucosa que recubre las células epiteliales del colon (colonocitos). La mucosa se encuentra constituida por un complejo de glicolípidos, glicoproteínas, y una gran variedad de residuos de azúcares incluyendo D-galactosa, fucosa, ácidos siálicos, glucuronato, galacturonato, gluconato, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina. Cuando se desprende la mucosa, los residuos de azúcares constituyen la fuente de carbono principal que permite un rápido crecimiento bacteriano y al mismo tiempo contribuye a la acumulación local de acetato y otros AGCC, condiciones que mantienen el pH del colon entre 6 y 8. Los AGCC constituyen aproximadamente las dos terceras partes de la concentración de aniones en el colon (70 a 130 mM), principalmente como acetato, propionato y butirato. De ellos, el acetato es el predominante. Los AGCC realizan funciones de gran importancia para la salud del huésped. Cuando estos AGCC son absorbidos por la mucosa del colon, se convierten en la fuente principal de energía para los colonocitos, las células hepáticas, los adipositos y las células musculares (120). Por el contrario, estos

AGCC aumentan el grado de virulencia de ciertos patógenos entéricos, incluyendo *E. coli* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, regulando la expresión de factores de virulencia a través de los sistemas de de dos componentes (60, 96).

En este trabajo se demostró que el formato, acetato y otros AGCC tales como propionato, butirato, valerato y caproato son estímulos fisiológicos directos para el sistema de transducción de señales de dos componentes BarA/UvrY en *E. coli*. También se determinó que en la activación del sistema no se requiere la formación de acetil-P a pesar de que este puede activar la vía de señalización a través de UvrY. La estructura química de estos AGCC es similar, compartiendo en común el grupo carboxilo, el cual se ha demostrado que es esencial para la activación del sistema. De acuerdo con los experimentos de competencias se ha propuesto que estos AGCC pueden actuar en una misma región de BarA, sin embargo dicha región aún se desconoce. Basado en el alineamiento en la secuencia de aminoácidos de la región periplásmica de BarA y de sus CS homólogas es posible especular acerca de la posible región de interacción con el estímulo. En esta región periplásmica es posible encontrar residuos de aminoácidos conservados con cadenas laterales que contienen grupos imidazol o tiol, que podrían formar transitoriamente un enlace covalente con el grupo carboxilo del ácido acético. Una de las evidencias experimentales que apoya la idea de que la interacción del ácido acético podría ser en la región periplásmica de BarA, se basa en las propiedades ácido-base de estos AGCC. De acuerdo con los resultados en la figura 10, se observó un aumento significativo en la expresión del reportero *csrB-lacZ* asociado a un patrón de tipo sigmoidal dependiente de la concentración del ácido fórmico, dentro de un intervalo de 0.1 y 0.2 mM. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la forma permeable del formato, durante el paso a través del periplasma interaccione con BarA. Estos resultados se pueden explicar de la siguiente manera. Cuando *E. coli* crece en un medio con un pH externo entre 4.5 y 9.0 no se observan diferencias importantes en el pH del citoplasma, manteniendo valores de 7.2 a 7.8. Adicionalmente el pH del periplasma es básicamente igual al del medio externo (116). Como consecuencia, cuando estos AGCC se adicionan al medio, la

forma disociada (básica) no puede atravesar la membrana externa, mientras que la forma no disociada (ácida) sí puede difundir en ella. Este proceso de difusión es dependiente del gradiente de pH transmembranal. Una vez que el ácido se encuentra en la región periplásmica, éste difunde nuevamente a través de la membrana interna hacia el citoplasma, en donde el pH básico interno induce rápidamente la disociación del ácido en un protón y en un anión. El protón acidifica el citoplasma, mientras que el anión aumenta la presión osmótica interna. Sin embargo, para comprobar lo anterior es necesario realizar futuros experimentos dirigidos hacia el estudio de la región periplásmica de BarA con el propósito de identificar los aminoácidos esenciales en la interacción con el ácido acético. Por lo que aún no se descarta la posibilidad de que la interacción se presente en las regiones transmembranales o en la región citoplásmica.

De acuerdo con diferentes evidencias experimentales se sugiere que BarA y sus homólogos pueden responder a un mismo estímulo. Sin embargo, el papel de los AGCC en los homólogos de BarA no es tan claro. En este sentido, se ha propuesto que en *Salmonella* el acetil-P formado a partir de acetato, regula la expresión de genes de invasión vía BarA. Sin embargo, otros AGCC como propionato y butirato tienen efectos opuestos al acetil-P, reduciendo la expresión de los genes de invasión (60). En este sentido, también se ha determinado que en *Pseudomonas fluorescens* los intermediarios del ciclo de Krebs, como 2-oxoglutarato, succinato y fumarato regulan la expresión de los RNAs pequeños RsmX y RsmY vía GacS/GacA, promoviendo un vínculo regulador entre el metabolismo primario y secundario (104).

Anteriormente, se ha demostrado que el sistema BarA/UvrY es esencial durante el cambio en la utilización de diferentes fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas. Además se ha observado que cuando *E. coli* crece en presencia de glucosa, el acetato comienza a producirse durante la fase exponencial. Durante esta fase CsrA se encuentra en su forma libre regulando positivamente a nivel postranscripcional la vía de glucólisis y negativamente la gluconeogénesis. Durante la transición a la fase estacionaria, los niveles de glucosa disminuyen y el acetato tiende a acumularse en el medio extracelular,

hasta llegar a una concentración determinada que induce la activación del sistema BarA/UvrY. En consecuencia, se aumenta la expresión de los RNAs pequeños CsrB y CsrC, favoreciendo su interacción con CsrA, promoviendo una disminución en la concentración de CsrA libre (6). Durante esta etapa se aumenta la expresión de la Acetil-CoA sintetasa (ACS) que participa en la asimilación del acetato. Esta incorporación tiene un efecto sobre los niveles de Acetil-P y por lo tanto en la fosforilación de una gran variedad de sistemas de dos componentes que participan en la regulación de diferentes procesos celulares.

Sin embargo la expresión de CsrB y CsrC también se encuentra regulado positivamente, directa o indirectamente por CsrA vía BarA/UvrY. El mecanismo directo de regulación positiva que ejerce CsrA sobre los RNAs mensajeros ha sido poco estudiado. Se conoce que CsrA regula positivamente a nivel postranscripcional la expresión del operón *FliHDC* que codifica para una subunidad del regulador maestro FliH₂C₂, el cual reconoce en un segundo nivel a los promotores flagelares para activar la síntesis del flagelo en *E. coli*. Esta regulación se lleva a cabo a través de la interacción de CsrA con el RNA mensajero del regulador maestro induciendo su estabilización y promoviendo su traducción (113). De acuerdo con estos datos, es posible que CsrA regule directamente la expresión de BarA y/o UvrY a través de un mecanismo similar al del regulador maestro. Alternativamente, es posible que esta regulación sea de forma indirecta a través de Hfq, una chaperona de RNA que regula positiva o negativamente a nivel postranscripcional la expresión genética. Esta chaperona promueve el apareamiento entre bases, durante la interacción del RNA mensajero con el RNA pequeño. Se conoce que CsrA interacciona con el RNA mensajero de *Hfq* en el sitio de unión al ribosoma, bloqueando su traducción (7). También se han observado dos efectos opuestos en una mutante CsrA. Por un lado, existe una disminución en la expresión de CsrB y CsrC y por otro lado se ha observado un aumento en la expresión de Hfq. Estos resultados sugieren la posibilidad de que Hfq regule positivamente la expresión de BarA y/o UvrY por interacción con sus RNAs mensajeros promoviendo su estabilización y su traducción. En el contexto fisiológico estos datos se pueden explicar de la

siguiente forma. Durante la fase de crecimiento exponencial, existe una concentración de acetato extracelular que no es suficiente para activar al sistema BarA/UvrY, en consecuencia, los niveles de expresión de los RNAs pequeños CsrB y CsrC se encuentran disminuidos, por lo que existe un aumento en la concentración de la proteína CsrA en su forma libre, lo cual induce una disminución en la expresión de la chaperona Hfq, promoviendo la disminución en la expresión de BarA y/o UvrY. Sin embargo, durante la fase estacionaria la concentración de acetato extracelular aumenta a tal grado que puede activar al sistema BarA/UvrY, en consecuencia, los niveles de expresión de CsrB y CsrC aumentan, promoviendo una disminución en la concentración de CsrA en su forma libre, lo cual induce un aumento en la expresión de Hfq y en consecuencia los niveles en la expresión de BarA y/o UvrY aumentarían. Si este es el caso, se estaría descubriendo un nuevo punto de control en la regulación del metabolismo del carbono en respuesta a un estatus metabólico cambiante.

CONCLUSIONES

1. El formato, acetato y otros ácidos carboxílicos de cadena corta son estímulos fisiológicos directos para el sistema de dos componentes BarA/UvrY en *E. coli*
2. La presencia del grupo carboxilo en estos ácidos grasos de cadena corta es esencial para la activación del sistema BarA/UvrY
3. La estructura ácida o permeable de estos ácidos carboxílicos activa al sistema BarA/UvrY.
4. El acetyl-P activa al sistema vía UvrY e independientemente de la función de BarA.

PERSPECTIVAS

1. Identificar el sitio de interacción entre BarA y los ácidos carboxílicos de cadena corta.
2. Conocer cuales son los aminoácidos esenciales en la activación del sistema BarA/UvrY.
3. Promover la fosforilación *in vitro* de BarA en presencia de los ácidos carboxílicos de cadena corta.
4. Conocer el mecanismo de activación del sistema BarA/UvrY en condiciones alcalinas (pH 7.0)
5. Conocer el papel de los intermediarios del ciclo de Krebs en la activación del sistema BarA/UvrY.
6. Conocer el papel del acetil-P en la activación del sistema BarA/UvrY en condiciones alcalinas.
7. Determinar el mecanismo de regulación del sistema BarA/UvrY dependiente de CsrA.
8. Determinar el papel de Hfq en la regulación de la expresión de CsrB y CsrC vía el sistema BarA/UvrY.
9. Determinar el estímulo del sistema BarA/UvrY.

REFERENCIAS

1. **Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de Mendoza D.** 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* **20**:1681–91
2. **Ahmer, B. M. M., J. van Reeuwijk, C. D. Timmers, P. J. Valentine, and F. Heffron.** 1998. *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family that regulates genes on the virulence plasmid. *J. Bacteriol.* **180**:1185-1193.
3. **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
4. **Appleman, J A., 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., and C. P. Ponting.** 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.* **22**:458–459.
6. **Babitzke, P., and T. Romeo.** 2007. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.***10**:156–163.
7. **Baker, C. S., L. A. Eory, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.***189**:5472–5481.
8. **Baker, C. S., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo, and P. Babitzke.** 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **44**:1599–1610.
9. **Baek JH, Kang YJ, Lee SY.** 2007. Transcript and protein level analyses of the interactions among PhoB, PhoR, PhoU and CreC in response to phosphate starvation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.***277**(2):254-9.
10. **Barret, J.F and J.A. Hoch.** 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998 Jul;**42**(7):1529-36
11. **Beier D, Gross R.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:143–52

12. **Bellolell L, Prieto J, Serrano L, Coll M.** 1994. Magnesium binding to the bacterial chemotaxis protein CheY results in large conformational changes involving its functional surface. *J Mol Biol*, **238**:489-495.
13. **Bhatt, S., A. N. Edwards, H. T. Nguyen, D. Merlin, T. Romeo, and D. Kalman.** 2009. The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **77**:3552–3568
14. **Blumer, C., G. Pessi, D. Haas.** 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprorttease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **23**; 96(**24**):14073-8.
15. **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.
16. **Busch A, Lacal J, Martos A, Ramos JL, Krell T.** 2007. Bacterial sensor kinase TodS interacts with agonistic and antagonistic signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:13774–79
17. **Clarke, M. B., Hughes, D. T., Zhu, C., Boedeker, E. C. & Sperandio, V.** 2006. The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**(27):10420–10425.
18. **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.
19. **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.
20. **Cavicchioli, R., R. C. Chiang, L. V. Kalman, and R. P. Gunsalus.** 1996. Role of the periplasmic domain of the *Escherichia coli* NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation. *Mol. Microbiol.* **21**:901-911.
21. **Cho, U. S., M. W. Bader, M. F. Amaya, M. E. Daley, R. E. Klevit, S. I. Miller, and W. Xu.** 2006. Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *J. Mol. Biol.* **356**:1193-1206.
22. **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.

23. **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.
24. **Dorsey, C.W., Tomaras, A.P., and Actis, L.A.** 2002. Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6353–6356.
25. **Djordjevic, S., P. N. Goudreau, Q. Xu, A. M. Stock, and A. H. West.** 1998. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1381-1386
26. **Dubey, A.K., CS. Baker, T Romeo, P. Babitzke.** 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA.* 11(10):1579-87.
27. **Dukky, 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.
28. **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.
29. **Epstein W.** 2003. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**:293–320
30. **Eriksson, AR., R.A. 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.
31. **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.
32. **Galperin, M. Y.** 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**:4169-4182.
33. **Gao, R and Stock, A.M.** 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2009, **63**:133-154.
34. **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.

35. **Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G.** 2005. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J. Inorg. Biochem.* **99**:1–22
36. **Goodier, R I., BM. Ahmer.** 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol.***183**:2249-2258.
37. **Grebe, T W., JB. Stock.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.* **41**:139-227.
38. **Grigoroudis AI, Panagiotidis CA, Lioliou EE, Vlassi M, Kyriakidis DA.** 2007. Molecular modeling and functional analysis of the AtoS-AtoC two-component signal transduction system of *Escherichia coli*.*Biochim BiophysActa.*1770(8):1248-58
39. **Gryllos I, Levin JC, Wessels MR.**2003. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg²⁺.*Proc Natl Acad Sci.USA.*100(7):4227-32
40. **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.
41. **Gutierrez, P., Y. Li, M. J. Osborne, E. Pomerantseva, Q. Liu, and K. Gehring.** 2005. Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:3496-3501
42. **Hagiwara D, Yamashino T, Mizuno T.**2004.A Genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses. *Biosci Biotechnol Biochem.*68(8):1758-67
43. **Hammer, B.K., Tateda, E.S., and Swanson, M.S.**2002.A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **44**: 107–118.
44. **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.
45. **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.

46. **Herren, CD., A Mitra, SK. 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.
47. **Hoch, JA.** 1993b. The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J Cell Biochem.* 51(1):55-61.
48. **Hoch, JA and Silhavy, T.J.** 1995. Two-component signal transduction, Washington D.C.
49. **Hutchings MI, Hong HJ, Buttner MJ.** 2006. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 59:923–35
50. **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.
51. **Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13:5195–5202.
52. **Jackson, D W., K. Suzuki, L. Oakford, J W. 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.
53. **Jiang, P and Ninfa A.J.** 1999. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol.* 181:1906–11
54. **Jonas, K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Romling, and O. Melefors.** 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* 70: 236–257.
55. **Kaspar S, Perozzo R, Reinelt S, Meyer M, Pfister K.** 1999. The periplasmic domain of the histidine autokinase CitA functions as a highly specific citrate receptor. *Mol. Microbiol.* 33:858–72
56. **Kneuper, H., I. G. Janausch, V. Vijayan, M. Zweckstetter, V. Bock, C. Griesinger, and G. Unden.** 2005. The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280:20596-20603.

57. **Krell T, Lacal J, Busch A, Silva-Jiménez H, Guazzaroni ME, Ramos JL.** 2010. Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol.* **64**:539-59.
58. **Kwon, O., D. Georgellis, AS, Lynch, D. Boyd, EC. Lin.** 2000. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli*: genetic exploration of the transmembrane region. *J. Bacteriol.* **182**:2960-2966.
59. **K. Lapouge, M. Schubert, F.H. Allain and D. Haas.** 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol. Microbiol.* **67**: 241–253.
60. **Lawhon, S. D., R. Maurer, M. Suyemoto, and C. Altier.** 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* **46**:1451–1464.
61. **Lee AI, Delgado A, Gunsalus RP.** 1999. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: Nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *J. Bacteriol.* **181**:5309–16
62. **Lenz, D.H., Miller, M.B., Zhu, J., Kulkarni, R.V., and Bassler, B.L.** 2005. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* **58**: 1186–1202.
63. **Li M, Hazelbauer GL.** 2004. Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J. Bacteriol.* **186**:3687–94
64. **Liu, Y., and T. Romeo.** 1997. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **179**:4639-4642.
65. **Liu, Y., Y. Cui, A. Mukherjee, AK. Chatterjee.** 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.
66. **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.
67. **Liu, X., G. R. Pena Sandoval, B. L. Wanner, W. S. Jung, D. Georgellis, and O. Kwon.** 2009. Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **47**:657–662.

68. **Lukat, G S., 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.
69. **Mascher, T., Helmann, J. D. & Uden, G.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–938.
70. **Maeda T, Wurgler-Murphy SM and Saito H.**1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242–245.
71. **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.
72. **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.
73. **Miller, JH.** Experiments in Molecular Genetics.1972. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.352-355.
74. **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.
75. **Monson EK, Ditta GS, Helinski DR.**1995.The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*.Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction.*J Biol Chem.* **270(10)**:5243-50.
76. **Möker N, Reihlen P, Krämer R, Morbach S.** 2007. Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*.*J Biol Chem.***282(38)**:27666-77
77. **Moore JO, Hendrickson WA.** 2009. Structural analysis of sensor domains from the TMAO-responsive histidine kinase receptor TorS.*Structure.***17(9)**:1195-204.
78. **Mondragon, V., B. Franco, K. Jonas, K. Suzuki, T. Romeo, O. Melefors, and D. Georgellis.** 2006. pH-dependent activation of the BarA-UvrY two-component system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:8303-8306.

79. **Moolenaar, G. F., C. A. van Sluis, C. Backendorf, and 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**:4273-4289.
80. **Munson GP, Lam DL, Outten FW, O'Halloran TV.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **182**(20):5864-71.
81. **Müller S, Götz M, Beier D.** 2009. Histidine residue 94 is involved in pH sensing by Histidine Kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE* **4**(9): e6930
82. **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.
83. **Neiditch, M B., M.J. Federle, S.T. Miller, B.L. Bassler, F.M. Hughson.** 2005. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell.* **27**; **18**(5):507-518.
84. **Neiditch MB, Federle MJ, Pompeani AJ, Kelly RC, Swem DL.** 2006. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell.* **126**:1095–108
85. **Parkinson J.S and Kofoed E.C.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* **26**:71-112
86. **Pernestig, A. K., D. Georgellis, T. Romeo, K. Suzuki, H. Tomenius, S. Normark, and O. Melefors.** 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J. Bacteriol.* **185**:843–853.
87. **Pernestig, A. K., 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.
88. **Purcell EB, Siegal-Gaskins D, Rawling DC, Fiebig A, Crosson S.** 2007. A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:18241–46
89. **Rampersaud, A., Inouye, M.** 1991. Procaine, a local anesthetic, signals through the EnvZ receptor to change the DNA binding affinity of the transcriptional activator protein OmpR. *J Bacteriol* **173**: 6882–6888.

90. **Regelmann, A G., 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.
91. **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.
92. **Rietkötter E, Hoyer D, Mascher T.** 2008. Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 68(3):768-85.
93. **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.
94. **Romeo, T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* **29**:1321–1330.
95. **Sabnis, N. A., H. Yang, and T. Romeo.** 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* **270**:29096–29104.
96. **Sawers, G.** 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**:57–88.
97. **Snyder WB, Davis LJ, Danese PN, Cosma CL, Silhavy TJ.** 1995. Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *177(15)*:4216-23.
98. **Shu, C. J., and I. B. Zhulin.** 2002. ANRAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**:3-5.
99. **Stewart, V.** 2003. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **31**:1-10
100. **Stock, AM., VL. Robinson, PN. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69:183-215.
101. **Stock, JB., Ninfa, A.J., Stock, AM** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53:450-490.
102. **Suzuki, K., P. Babitzke, S. R. Kushner, and 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.* **20**:2605–2617.

103. **Suzuki, K., X. Wang, T. Weilbacher, A. K. Pernestig, O. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 5130–5140.
104. **Takeuchi, K., P. Kiefer, C. Reimann, C. Keel, C. Dubuis, J. Rolli, J. A. Vorholt, and D. Haas.** 2009. Small RNA-dependent expression of secondary metabolism is controlled by Krebs cycle function in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **284**:34976–34985.
105. **Taylor, B.L., I.B. Zhulin.** 1999. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**:479-506.
106. **Tomenius, H., A. K. Pernestig, C. F. Mendez-Catala, D. Georgellis, S. Normark, and 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**:7317–7324.
107. **Tomenius, H., A. K. Pernestig, K. Jonas, D. Georgellis, R. Mollby, S. Normark, and 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.
108. **Uhl, M.A., J.F. Miller.** 1996. Integration of multiple domains in a two component sensor protein: The *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* **15**:1028-1036.
109. **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 Microbiol.* **50**(4):1361-1379.
110. **Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. 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.
111. **West, A.H, and Stock, A.M.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling system. *Trends Biochem Sci* **26**:369-376
112. **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.

113. **Wei, B. L., A. M. Brun-Zinkernagel, J. W. Simecka, B. M. Pruss, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**:245–256.
114. **Weilbacher, T., K. Suzuki, A. K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo.** 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**:657–670.
115. **Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J., and Salmond, G.P.** 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* **4**: 887–899.
116. **Wilks and Slonczewski.** 2007. J.C. Wilks and J.L. Slonczewski, pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J. Bacteriol.* **189**:5601–5607.
117. **Yamamoto K, Ishihama A.** 2006. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **70** (7):1688-95.
118. **Yang, H, MY. 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.
119. **Jung, K., Hamann, K. & Revermann, A.** 2001. K⁺ stimulates specifically the autokinase activity of purified and reconstituted EnvZ of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**, 40896–40902
120. **Wolfe, A. J.** 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:12–50.
121. **Zhang, J. P., and S. Normark.** 1996. Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* **273**:1234-1236.
122. **Zuber, S., F. Carruthers, C. Keel, A. Mattart, C. Blumer, G. Pessi, C. Gigot-Bonnefoy, U. Schnider-Keel, S. Heeb, C. Reimmann, 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.