



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de algunas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas
sobre la formación de biopelícula en *Escherichia coli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GERARDO MEJÍA VÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. RICARDO OROPEZA NAVARRO

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Mejía

Vázquez

Gerardo

Universidad Nacional Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

Biología

309303149

2. Datos del tutor

Dr.

Ricardo

Oropeza

Navarro

3. Datos del sinodal 1

Dr.

José Luis

Puente

García

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis David

Alcaraz

Peraza

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Edén Marcela

Rodríguez

Flores

6. Datos del sinodal 4

Dr.

José Eduardo

Rodríguez

Bustamante

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de algunas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas sobre la formación de biopelícula en *Escherichia coli*.

45 p.

2017

***Lo más maravilloso de la
ciencia es que está viva
Richard Feynman***

La presente tesis se realizó en el laboratorio #2 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología bajo la asesoría del Dr. Ricardo Oropeza Navarro.

Para la realización de este trabajo se contó con los siguientes financiamientos:

- PAPIIT/DGAPA IN209216. "Proteínas involucradas en el balance de di-GMP cíclico (dGc) intracelular y su papel en la síntesis de biopelícula y en la expresión de factores de virulencia en *Escherichia coli*". Enero de 2016 a diciembre de 2018.
- CONACyT 252895. Convocatoria Ciencia Básica 2015. En la modalidad de Propuesta nueva, apoyo a iniciativas de Profesor-Investigador. "Formación de biopelícula y virulencia en *Escherichia coli*: papel de nuevos reguladores que modulan los segundos mensajeros intracelulares". Octubre de 2016 a diciembre de 2019.

Agradecimientos

El más grande agradecimiento a mis padres, Alejandro Mejía Guerrero y Libertad Vázquez Arrieta por todo el apoyo brindado desde siempre, por su amor incondicional, por cada consejo, por ser mis guías en la vida, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y seguiré adelante. Papá, te agradezco por forjar en mí un pensamiento crítico, que sin duda ha sido de mucha ayuda en la vida y en mi formación como científico. Mamá, gracias por enseñarme a cumplir mis metas y a no rendirme nunca. Gracias también, por caminar siempre a mi lado a lo largo de mi vida y durante éste arduo camino académico que empezó aquellos días en los que me ayudabas a brincar esa pequeña barda para acortar el camino al kínder.

Gracias a mi hermana Alejandra por ser el más claro ejemplo de responsabilidad, dedicación y esfuerzo. Gracias por estar presente en todo momento, por los consejos, las asesorías y el apoyo que siempre me has dado.

Agradecimiento especial a Maureen Covarrubias. Por su hermosa compañía, por los bellos momentos a su lado, por crecer juntos, por ser luz cuando siento todo oscuro, por ser fuente de inspiración y por motivarme a seguir adelante todos los días. Gracias por creer en mí y por darme todo tu apoyo siempre.

Al Dr. Ricardo Oropeza Navarro por su amistad, por las enseñanzas en el laboratorio, por su asesoría en la realización de los experimentos, por su paciencia, por los comentarios, correcciones y mejoras a esta tesis.

A los miembros del jurado: Dr. José Luis Puente, Dr. Luis David Alcaraz, Dr. José Eduardo Rodríguez y Dra. Edén Marcela Rodríguez por sus acertadas correcciones que mejoraron sustancialmente el trabajo escrito. Así mismo, quiero agradecer especialmente al Dr. José Luis Puente por su amistad, consejos y todas las charlas compartidas, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la organización y tiempo dedicado al taller.

A los integrantes del grupo Calva-Puente: Doña Rebe, Mario, Carmen, Pancho, Haydee, Ale Vázquez, Álvaro, Inés, Emilio, Paola, Steph, Emma, Abraham, Ramón. Roger, Luci, Rosalvita, Amapola, Dr. Edmundo, Lili, Esteban, Ismael, Lore, Marcos V., Magda, Crispín, Claudia P., Deyanira y Jess, porque siempre tendré un grato recuerdo de la estadía en mi primer laboratorio. Agradecimiento especial a aquellos con los que pude establecer una amistad y compartir más momentos: Haydee, Inés, Ale Vázquez, Lili y Marcos V.

A Joseph y Joshua, mis primos, que en la vida han sido como mis hermanos, gracias por los juegos, risas y bromas. Joseph, por enseñarme que no importa lo que los demás piensen de tu pasión, dedícate a ella. Joshua, por tu entusiasmo y porque ser el más pequeño jamás te ha limitado.

A mis tíos: Norma Gómez, Francisco Quiroz y Patricia Mejía, gracias por esos excelentes momentos en familia y por aquellos no tan gratos en los que siempre han estado presentes para mí, mis papás y mi hermana.

A los amigos que hice en la facultad: Horacio, Eugenio, Axel, Daniel, Fernanda y Alin, por cada momento de diversión juntos y por compartir este extraño gusto por el estudio de la vida.

A Xavier, mi amigo más antiguo y que al paso de los años puedo seguir diciendo que aún lo es.

A quienes hicieron de Cuernavaca un lugar menos difícil para vivir y que se convirtieron en grandes amigos: Alonso, Toño, Erik y Nicolás.

Gracias a todos mis profesores de la Facultad, principalmente a: Dr. Eduardo Rodríguez, Dra. Edén Rodríguez, Dr. Luis Robledo, M en C. Alfonso Vilchis y Dr. Víctor Valdés de quienes aprendí mucho en sus clases y motivaron mi gusto por la biología molecular y la microbiología.

Por último, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella, por abrirme las puertas desde el bachillerato, por darme la mejor formación académica, científica y cultural. Porque a pesar de las carencias y dificultades invariablemente destaca entre las mejores. Siempre será un orgullo para mí, haber sido y seguir siendo parte de la máxima casa de estudios "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITU".

Abreviaturas

c-di-GMP	bis-(3',5')- di-guanosin monofosfato cíclico
DGC	diguanilato ciclasa
DGCs	diguanilato ciclasas
EPS	sustancias poliméricas extracelulares
fb	formación de biopelícula
GTP	guanosin-trifosfato
nd	No dato
PDE	fosfodiesterasa
PDEs	fosfodiesterasas
PGA	Poli- β -1,6-N-acetilglucosamina
poly-GlcNAc	Poli- β -1,6-N-acetilglucosamina
pppG3'p5'G	diguanosín-tetrafosfato

Contenido

Abreviaturas	7
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	12
2.1 Formación de biopelícula	12
2.2 c-di-GMP	13
2.3 Control por c-di-GMP.....	14
2.4 Regionalización del di-GMP cíclico y módulos de control	16
2.5 poly-GlcNAc (PGA) y operón <i>pgaABCD</i>	16
2.6 Antecedente experimental.....	17
2.6.1 Características de las DGCs y PDEs bajo estudio.....	17
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos particulares	20
4. Hipótesis.....	20
5. Método	21
5.1 Generación de mutantes	21
5.2 Sistema para inducir la formación de biopelícula / construcción de fusión reportera	21
5.3 Cuantificación de biopelícula	22
5.4 Cuantificación de la expresión de la fusión reportera <i>pgaA-lacZ</i>	23
5.5 Análisis estadístico.....	25
6. Resultados.....	25
6.1 Ensayo de cuantificación de biopelícula	25
6.1.1 Inducción de biopelícula a través del promotor de arabinosa	26
6.1.2 El cassette de kanamicina altera la formación de biopelícula	26
6.1.3 Mutantes en enzimas PDE	27
6.1.4 Mutantes en enzimas DGC.....	28
6.2 Ensayo de cuantificación de fusión reportera <i>pgaA-lacZ</i>	28
6.2.1 Nivel de transcripción del operón <i>pgaABCD</i> con el cassette de kanamicina.....	29
6.2.2 La expresión del operón <i>pgaABCD</i> se recupera en algunas dobles mutantes.....	30
7. Discusión.....	32
7.1 PdeL está involucrada en la producción de PGA.....	32

7.2 $\Delta pdeB$ presenta un fenotipo no esperado.....	33
7.3 $\Delta pdeB$ produce biopelícula en condiciones no inductoras	34
7.4 DgcO, DgcZ y DgcC son importantes para la transcripción del operón <i>pgaABCD</i> ..	34
7.5 Las dobles mutantes $\Delta pdeB / \Delta dgcT$, $\Delta dgcC / \Delta dgcT$ recuperan la expresión del operón <i>pgaABCD</i>	35
7.6 DgcT y PdeB podrían estar controlando algunas DGCs y PDEs a través de las concentraciones de c-di-GMP	35
7.7 Los resultados para DgcN no permiten colocarla dentro del modelo propuesto.....	37
7.8 La producción de biopelícula se reduce a las 24 h en algunos ensayos.....	38
8. Conclusiones	38
9. Perspectivas	39
10. Literatura citada	39
11. Anexos	44

Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar si algunas DGCs y PDEs afectan la formación de biopelícula en *Escherichia coli* a través de la regulación del operón *pgaABCD*, el cual es responsable de la síntesis del polímero PGA. Para esto se generaron mutantes en diferentes DGCs y PDEs, así como dobles mutantes donde se eliminó el gen *dgcT* en combinación con la eliminación de alguna otra DGC o PDE. Se cuantificó la producción de biopelícula y la expresión del operón *pgaABCD*. Con los resultados obtenidos se propone la existencia de dos pozas de c-di-GMP, que regulan el operón *pgaABCD* y por tanto la síntesis de PGA. La primera es controlada por DgcT y PdeB, regula la actividad de DgcC y DgcO. Éstas, junto con PdeL regulan la concentración de c-di-GMP en una segunda poza responsable de activar factores transcripcionales para el operón *pgaABCD*.

1. Introducción

La supervivencia de las bacterias, en diferentes ambientes, depende de su habilidad para responder y ajustarse a los requerimientos de su entorno. En este sentido, las bacterias han adquirido numerosos mecanismos para detectar su entorno a través de señales que conllevan una serie de respuestas celulares (Jonas *et al.*, 2008).

Desde hace tiempo, se sabe que las bacterias pueden vivir en estado planctónico, es decir flotando de forma dispersa en líquidos, o formando agregados que les permiten adherirse a superficies (Flemming y Wingender, 2010). Esta estructura de células procariotas recibe el nombre de biopelícula o *biofilm* y es considerada la forma dominante de crecimiento bacteriano en hábitats naturales, ambientes clínicos y algunas enfermedades (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

La formación de biopelícula representa una protección que favorece el crecimiento bacteriano en ambientes hostiles (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Costerton *et al.*, 1999). Las biopelículas no son simples conjuntos de células que se pegan a la superficie, se trata de sistemas biológicos que presentan una gran complejidad en cuanto a su estructura y dinámica. Son definidos como un grupo organizado de microorganismos que viven dentro de una matriz producida por ellos mismos, la cual contiene polímeros y les ayuda a adherirse a una gran variedad de superficies bióticas y abióticas (Hurlow *et al.*, 2015; Costerton *et al.*, 1999).

Una biopelícula puede estar formada por comunidades homogéneas o heterogéneas de bacterias (Gupta *et al.*, 2015). Los polímeros componentes de la matriz son llamados sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y en su mayoría son polisacáridos, sin embargo, también se pueden encontrar moléculas como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Gupta *et al.*, 2015) (Fig. 1). El análisis de EPS realizado por Hall-Stoodley *et al.*, 2004 demuestra que las biopelículas son hidrogeles que presentan un comportamiento viscoso.

Las EPS inmovilizan las células dentro de la biopelícula, lo que les permite tener una gran cercanía entre ellas favoreciendo las interacciones célula-célula y la comunicación con un efecto sinérgico. Además, las EPS retienen los componentes de las bacterias lisadas permitiendo que estén disponibles para ser utilizados como nutrientes por el resto de bacterias que forman la biopelícula; así mismo las EPS retienen material genético que puede ser usado en la transferencia horizontal de genes (Fleming y Wingender, 2010) (Fig. 1).

La matriz de la biopelícula protege a las bacterias de condiciones desfavorables como: desecación, antibióticos, radiación ultravioleta y ataques de células del sistema inmune (Fleming y Wingender, 2010). Es claro que las biopelículas proveen protección a las células procariotas, por lo que en la historia de la evolución bacteriana han sido importantes para hacer frente a diferentes condiciones como: altas temperaturas y exposición a rayos UV, además de facilitar

interacciones célula-célula y promover la transferencia horizontal de genes (Hall-Stoodley *et al.*, 2004) (Fig. 1).

A nivel ecológico, las biopelículas participan en la degradación de materia orgánica, en la remediación de suelos contaminados con metales y sulfuro, en la purificación de agua residual y contaminada con petróleo, y en el proceso de nitrificación del suelo (Gupta *et al.*, 2015). Por otro lado las biopelículas se asocian a infecciones crónicas y a las recaídas de infección (infecciones recurrentes), así mismo son importantes contaminantes de materiales hospitalarios (Steiner *et al.*, 2013; Mah y O'Toole, 2001; Costerton *et al.*, 1999;) (Fig.1).

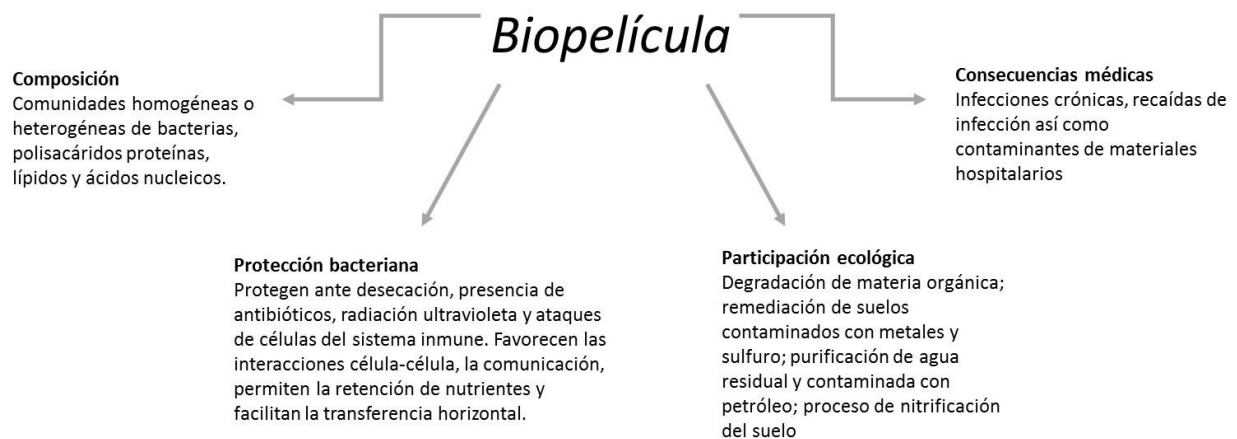


Fig. 1 Composición, importancia, funciones fisiológicas y ecológicas de las biopelículas.

2. Antecedentes

2.1 Formación de biopelícula

La capacidad de formar biopelícula se encuentra presente en gran cantidad de bacterias, pero el mecanismo por el cual se produce varía de acuerdo a la cepa y a los diferentes ambientes que ocupe (Martínez y Vadyvaloo, 2014). El proceso de formación de biopelícula tiene muchas variantes sin embargo el ciclo, de manera general, se divide en: la adhesión reversible de células individuales a alguna superficie, seguida de su replicación, adhesión irreversible, comunicación célula-célula, maduración y dispersión (Gupta *et al.*, 2015; Martínez y Vadyvaloo, 2014; Stoodley *et al.*, 2002).

La primer fase depende de interacciones fisicoquímicas entre la envoltura bacteriana y la superficie de adhesión (Martínez y Vadyvaloo, 2014), la adhesión a superficies es facilitada por organelos como *pili* tipo IV y flagelo; estos pueden sumarse a las interacciones fisicoquímicas o bien actuar de manera independiente para facilitar la adhesión (Gupta *et al.*, 2015; Martínez y Vadyvaloo, 2014). Las

primeras células que forman la biopelícula están rodeadas por una pequeña cantidad de exopolímeros, estas células adheridas aún no están “obligadas” a seguir el proceso de formación de biopelícula y pueden dispersarse en esta etapa, por lo que esta fase presenta adhesión reversible (Gupta *et al.*, 2015; Stoodley *et al.*, 2002). Posteriormente las bacterias se replican y forman microcolonias y en algunos casos se comunican a través de *quorum sensing* para dar paso al desarrollo de la biopelícula (Martínez y Vadyvaloo, 2014).

Durante la segunda fase, las células adheridas reversiblemente se inmovilizan y se convierten en células adheridas irreversiblemente. Es descrita como la transición de células que interactúan débilmente con el sustrato a células con fuerzas atractivas mayores que las fuerzas repulsivas, consumando así la interacción bacteria-superficie (Gupta *et al.*, 2015; Stoodley *et al.*, 2002).

En la siguiente fase, la maduración, las células comienzan a comunicarse una con otra para producir señales que conllevan a la expresión de genes específicos para la producción de biopelícula (Gupta *et al.*, 2015). Esta fase se caracteriza por la secreción de EPS para estabilizar la red de biopelícula y de esta manera dar origen a su estructura tridimensional (Gupta *et al.*, 2015; Martínez y Vadyvaloo, 2014).

En la fase de dispersión las bacterias se propagan, es decir, se vuelven planctónicas y pueden volver a colonizar nuevas superficies, en función de las condiciones ambientales (Gupta *et al.*, 2015; Martínez y Vadyvaloo, 2014). Para lograr esto, las células dentro de la biopelícula producen enzimas que rompen los polisacáridos de la matriz, desestabilizándola y liberando a las bacterias que se encuentran en la zona más externa (Gupta *et al.*, 2015); de esta manera se puede reiniciar el ciclo.

2.2 c-di-GMP

La formación de biopelícula depende de señales intracelulares y ambientales que en conjunto resultan en eventos de regulación. Los estímulos ambientales son detectados por las bacterias y éstos encienden un conjunto de vías de señalización que a su vez activan, a diferentes niveles, la síntesis de moléculas necesarias para producir la biopelícula (Gupta *et al.*, 2015). El segundo mensajero bis-(3',5')- di-guanosin monofosfato cíclico (c-di-GMP), es una molécula pequeña descrita por primera vez como un activador alostérico en la síntesis de celulosa en *Gluconacetobacter xylinus* (Benziman *et al.*, 1987). Interviene en procesos bacterianos de motilidad, quimiotaxis, colonización, virulencia y progresión del ciclo celular (Reinders *et al.*, 2015).

Desde su descubrimiento, el c-di-GMP ha sido implicado en gran número de funciones celulares como la activación de virulencia, la progresión del ciclo celular y la producción de antibióticos, por lo que se considera un segundo mensajero universal bacteriano (Hengge, 2009). Se sabe que tiene gran importancia en la

formación de biopelícula debido a que estimula la síntesis de adhesinas y exopolisacaridos e inhibe varias formas de motilidad como la expresión o la velocidad de rotación del flagelo. Estos reportes soportan la idea de que el c-di-GMP controla el cambio entre los estilos de vida planctónico y sésil con la formación de biopelícula (Povolotsky y Hengge 2016; Römling *et al.*, 2013; Hengge, 2009; Tamayo *et al.*, 2007).

2.3 Control por c-di-GMP

Típicamente, un sistema integrado por un segundo mensajero contiene enzimas que en respuesta a ciertas señales lo degradan y sintetizan, una molécula llamada efector que es alostéricamente regulado por el segundo mensajero, y un blanco que en respuesta a la unión con el efector produce una respuesta molecular (Hengge, 2009). Las enzimas encargadas de la síntesis y degradación del c-di-GMP son las diguanilato ciclasas (DGCs) y las fosfodiesterasas (PDEs), respectivamente (Benziman *et al.*, 1998).

Las DGCs forman un homodímero donde los dos monómeros se orientan para formar un sitio activo. Cada monómero toma una molécula de guanosa-trifosfato (GTP) y las convierten en c-di-GMP a través de un intermediario llamado diguanosín-tetrafosfato (pppG3'p5'G). El motivo GG(D/E)EF (Gly-Gly-(Asp/Glu)-Glu-Phe) se asocia con la actividad de DGC, es el sitio de unión de GTP y es conocido como el centro activo o sitio A. Las primeras dos glicinas del sitio A están encargadas de la unión del GTP, el residuo Glu en la posición cuatro se asocia con la coordinación de iones y en la posición tres alguno de los aminoácidos Asp/Glu son indispensables para la catálisis además de coordinar iones (Povolotsky y Hengge 2012; Hengge, 2009). Algunas DGC contienen un motivo secundario e inhibitorio, conocido como sitio I, al cual se une c-di-GMP; su actividad es inhibir la producción de c-di-GMP cuando se encuentra en altas concentraciones (Povolotsky y Hengge 2012; Hengge, 2009) (Fig. 2).

Por su parte las PDE rompen el c-di-GMP transformándolo en dos moléculas de GMP con el intermediario 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosa (pGpG), el cual subsecuentemente es convertido a GMP (Jenal, 2004; Hengge, 2009). Estas enzimas se caracterizan por la presencia de motivos EAL (Glu-Ala-Leu) o HD-GYP (His-Asp-Gly-Tyr-Pro) asociados a la actividad catalítica (Povolotsky y Hengge 2016; Hengge, 2009). Una PDE con motivo EAL es una enzima monomérica que requiere como cofactor Mg^{2+} o Mn^{2+} y es inhibida por Ca^{2+} y Zn^{2+} (Hengge, 2009) (Fig. 2).

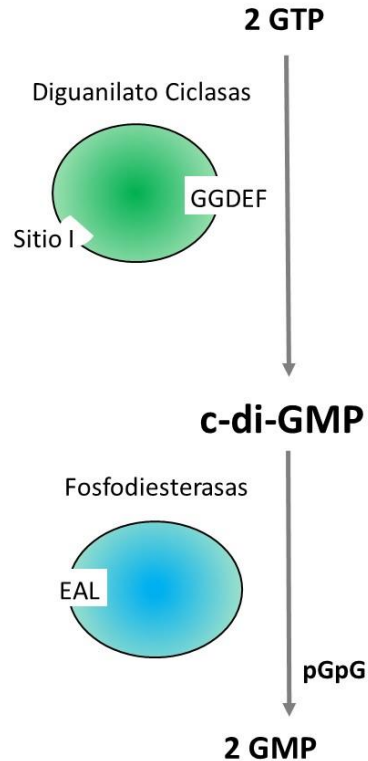


Fig. 2 Síntesis y degradación de c-di-GMP. Para la síntesis, cada monómero de DGC toma una molécula de GTP y las convierte en c-di-GMP, algunas contienen un motivo secundario de inhibición, conocido como sitio I. Las PDE rompen el c-di-GMP transformándolo en dos moléculas de GMP con el intermediario pGpG y se caracterizan por la presencia de motivos EAL o HD-GYP.

Los motivos catalíticos de las DGCs y PDEs, normalmente, forman parte de proteínas con dominios relacionados a la percepción de señales. Así, señales endógenas o del ambiente pueden controlar la activación de los motivos catalíticos y a su vez los niveles de c-di-GMP (Sundriyal *et al.*, 2014). Sumado a esto, existen motivos proteicos parecidos a los que poseen las DGCs y PDEs pero con ligeros cambios, estos motivos no son catalíticos y han adoptado la función de detección del c-di-GMP. Por su parte existen también motivos degenerados que podrían funcionar como secuestradores de c-di-GMP (Sundriyal *et al.*, 2014).

Actualmente se sabe que *Escherichia coli* K12 codifica para 29 proteínas con motivo GGDEF o EAL de las cuales 12 poseen únicamente el motivo GGDEF, 10 poseen únicamente el motivo EAL y 7 están compuestas por ambos motivos. Sin embargo solo se ha comprobado la actividad en 12 DGCs y 13 PDEs mientras las 4 proteínas restantes tienen motivos degenerados GGDEF/EAL (Hengge *et al.*, 2016). Los motivos GG(D/E)EF, EAL, HD-GYP pueden existir independientes dentro de una proteína, sin embargo, existen proteínas que llevan el motivo

GGDEF unido covalentemente al motivo EAL o HD-GYP; usualmente estas proteínas poseen una de las dos actividades (Hengge, 2009).

Recientemente Hengge *et al.*, 2016 propusieron una nueva nomenclatura para las proteínas que poseen motivos GGDEF o EAL, con el fin de simplificar y hacer más fácil su memorización. Primeramente los genes deben ser nombrados acorde a su función molecular PDE o DGC. Así mismo, esta nomenclatura propone que después de la función molecular se agregue la letra final con la que originalmente se conocía el gen. Es deseable que esta última letra pueda estar relacionada con su función, en caso de estar descrita (Hengge *et al.*, 2016).

2.4 Regionalización del di-GMP cíclico y módulos de control

Como se mencionó anteriormente el c-di-GMP regula alóstericamente a moléculas llamadas efectores para producir una respuesta de salida. Sin embargo, los efectores son activados bajo distintas condiciones dando como resultado que las variaciones en la concentración de c-di-GMP, en muchas ocasiones, no promuevan respuestas convergentes. Se ha sugerido la existencia de subregiones dentro de la célula con diferentes concentraciones locales de c-di-GMP. Esta idea es apoyada por una serie de características descritas para la señalización por c-di-GMP. La expresión y activación de las enzimas con motivos GGDEF y EAL ocurre únicamente bajo condiciones específicas, es decir, no todas las enzimas están presentes y activas en el mismo tiempo y espacio (Hengge, 2009). Así mismo, existen reportes como los de Oglesby *et al.*, (2008) y Bobrov *et al.*, (2008) sobre la localización específica de DGCs y PDEs. Cada efector posee diferente afinidad por c-di-GMP, es decir, la concentración total de la célula no es necesariamente la misma concentración efectiva para cada efector. En conjunto estas características sugieren la existencia de gradientes de concentración de c-di-GMP a través de regiones específicas en la célula (Hengge, 2009).

2.5 poly-GlcNAc (PGA) y operón *pgaABCD*

La Poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (poly-GlcNAc o PGA) es un homopolímero lineal que está relacionado con la formación de biopelícula. Es utilizado como adhesina para la colonización de superficies y adhesión intercelular, se ha reportado que puede promover la virulencia y contribuir a la supervivencia dentro del hospedero. Se encuentra presente en biopelículas sintetizadas por una amplia variedad de bacterias incluyendo *E. coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Yersinia pestis* y el género *Bordetella*, entre otras (Steiner *et al.*, 2013; Boehm *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004).

En *E. coli*, la PGA es sintetizada y secretada por cuatro proteínas, las cuales se encuentran codificadas en el operón *pgaABCD* (Wang *et al.*, 2004). PgaA es una proteína de membrana externa que funciona como poro para traslocar al exterior PGA conforme va creciendo la cadena. PgaB es una lipoproteína putativa de membrana externa, orientada hacia el periplasma, que desacetila algunos de los

residuos GlcNAc durante la exportación de PGA (Itoh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). Por su parte, PgaC es una β -glicosiltransferasa que se localiza en la membrana interna y polimeriza PGA a partir del precursor UDP-GlcNAc (Itoh *et al.*, 2008), sin embargo se ha reportado que esta capacidad se abate en ausencia de PgaD. PgaD es una proteína pequeña que forma un complejo con PgaC, el cual es receptor de c-di-GMP y al unirse con su ligando estabiliza la interacción de ambas proteínas promoviendo así la actividad enzimática de producción de PGA (Steiner *et al.*, 2013). Entonces, a bajas concentraciones de c-di-GMP la interacción del complejo PgaCD es inestable por lo que no se produce PGA, y a altas concentraciones de este segundo mensajero el complejo se estabiliza propiciando la actividad catalítica y la producción de PGA.

2.6 Antecedente experimental

Como antecedente directo de este trabajo se encuentra un experimento realizado por el Dr. Ricardo Oropeza Navarro en el que mediante ensayos de cuantificación de biopelícula, se encontró que la interrupción del gen *dgcT* (diguanylato ciclasa con motivo C-terminal GGDEF), con el transposón basado en *Himar1*, aumentaba la producción de PGA y por tanto de la biopelícula. Éste fue un fenotipo contrario a lo esperado para una DGC que al ser eliminada debería disminuir los niveles de c-di-GMP y bajar la producción de biopelícula.

Así mismo, en los ensayos se encontró una serie de genes codificantes para enzimas DGC y PDE que al ser mutados por transposición afectaron los niveles de formación de biopelícula. De este ensayo se seleccionaron los siguientes genes a estudiar: *dgcT*, *dgcC*, *dgcN*, *pdeL* y *pdeB*; adicionalmente se trabajó, como control, con los genes *dgcO* y *dgcZ* dado que han sido reportados previamente en la literatura como genes involucrados en la formación de biopelícula y relacionados con el operón *pgaABCD* (Steiner *et al.*, 2013; Tagliabue *et al.*, 2010b; Boehm *et al.*, 2009).

Con el objeto de corroborar y dar una explicación al fenotipo observado en la mutante en *dgcT*, en este trabajo, se decidió investigar el papel de DgcT a través de la generación de mutantes sencillas y dobles, en las que se eliminó un gen de DGCs o PDEs más la eliminación de *dgcT*. Estas mutantes permitieron que se planteara una explicación para el fenotipo observado.

2.6.1 Características de las DGCs y PDEs bajo estudio

dgcT (*ycdT*)

Es una diguanylato ciclasa con motivo C-terminal GGDEF y un dominio sensor tipo MASE4 N-terminal, anclado a la membrana interna mediante 8 segmentos (Hengge *et al.*, 2015; Povolotsky *et al.*, 2015; Jonas *et al.*, 2008). Al igual que *dgcZ* y *pgaABCD*, la expresión de *dgcT* es regulada a nivel post-transcripcional por el regulador CsrA (Jonas *et al.*, 2008). Se ha sugerido, que *dgcT* juega un

papel en la producción de PGA en *E. coli*, dado que esta situación ocurre en *Yersinia pestis* donde el homólogo de DgcT, HmsT, regula positivamente la síntesis de PGA. Adicionalmente, en *E. coli* se ha observado que la motilidad bacteriana se reduce al sobre expresar a *dgcT* lo que resulta en un incremento en la concentración de c-di-GMP (Jonas *et al.*, 2008).

pdeL (yahA)

Es una fosfodiesterasa citoplásmica con un motivo catalítico EAL, presenta un dominio de unión a DNA tipo LuxR en el extremo N-terminal (Reinders *et al.*, 2015; Sundriyal *et al.*, 2014). Pertenece a un grupo de enzimas conocido como “*trigger enzymes* PDEs” las cuales unen y degradan c-di-GMP; actuando como efector (Hengge, 2009). Se ha reportado que adicional a su función enzimática puede actuar como factor transcripcional activando su propia expresión, uniéndose a una región río arriba de su promotor (Reinders *et al.*, 2015).

pdeB (ylaB)

Se trata de una enzima con motivo EAL, con actividad putativa de fosfodiesterasa y se predice que posee dos dominios transmembranales. Además posee un dominio periplásmico en el extremo N-terminal, funcionalmente no caracterizado, conocido como CSS, (Hengge *et al.*, 2016; Povolotsky y Hengge, 2016).

dgcC (yaiC, adrA)

DgcC es una diguanilato ciclasa que se ha asociado con la biosíntesis de celulosa; sin embargo, el mecanismo por el cual lo hace no es muy claro aún (Brombacher *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006; Zogaj *et al.*, 2001). Contiene una región integral de membrana N-terminal conocida como dominio MASE2 (*membrane-associated sensor*) el cual ha sido poco estudiado pero, se predice, que consiste en seis segmentos transmembranales (Nikolskaya *et al.*, 2003).

El gen *dgcC* ha sido mayormente estudiado en *Salmonella enterica* donde se le conoce como *adrA* (Römling *et al.*, 2000). Se sabe que en ambas bacterias este gen está bajo el control del regulador CsgD que a su vez está regulado por σ_s , un regulador importante en la respuesta general de estrés (Weber *et al.*, 2006).

dgcN (yfiN)

Pertenece al operón *yfiBNR* y se ha sugerido que tiene un papel importante en la colonización y persistencia en el hospedero en *Pseudomonas aeruginosa* y en *E. coli* uropatógena (Malone *et al.*, 2010). Se ha propuesto que *yfiN* es regulado por YfiR y YfiB (Malone *et al.*, 2010).

DgcN es una diguanilato ciclasa que funciona como activador alostérico de la proteína celulosa sintasa. Posee un motivo citoplásmico GGDEF en el extremo C-terminal y un dominio periplásmico N-terminal el cual es probablemente un dominio sensor de señal (Malone *et al.*, 2010). Se ha reportado que contribuye a la

concentración intracelular de c-di-GMP en diferentes bacterias, en general se ha descrito su actividad asociada a procesos de inhibición de motilidad y formación de biopelícula (Kim y Harshey, 2016; Sanchez-Torres *et al.*, 2011). Recientemente se encontró que es una proteína bifuncional que (1) produce c-di-GMP en respuesta a estrés y que (2) se reubica en el sitio de división para arrestar la formación del septo celular en respuesta a estrés en *E. coli* (Kim y Harshey, 2016).

dgcO (*yddV*, *dosC*)

Tiene un motivo C-terminal de diguanilato ciclasa GGDEF y un dominio sensor N-terminal GCSD (*Globin-Coupled-Sensor Domain*) el cual une oxígeno y controla la acción del motivo GGDEF y a su vez la producción de c-di-GMP (Tuckerman *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *dgcO* estimula la producción de poli-N-acetilglucosamina y la transcripción del operón *pgaABCD* (Tagliabue *et al.*, 2010a). Así mismo, DgcO puede activar la transcripción del operón *csgBAC*, el cual codifica para subunidades estructurales de curli (Tagliabue *et al.*, 2010b).

dgcZ (*ydeH*)

Es una diguanilato ciclasa con motivo catalítico GGDEF en el extremo C-terminal (Boehm *et al.*, 2009). Es directamente regulada a nivel post-transcripcional por el regulador CsrA, una proteína que controla el metabolismo de carbono (Jonas *et al.*, 2008). Se ha demostrado que, a través de la producción de c-di-GMP controla la biogénesis de PGA, estabilizando las proteínas de membrana interna PgaD y PgaC encargadas de la polimerización de PGA a partir del precursor UDP-GlcNAc (Steiner *et al.*, 2013; Boehm *et al.*, 2009); además, se ha propuesto que afecta los niveles proteicos de PgaD (Steiner *et al.*, 2013). Por otro lado, la actividad de diguanilato ciclasa de *dgcZ* es regulada alostéricamente por zinc, el cual se une a un dominio sensor localizado en el extremo N-terminal e inhibe la acción del motivo catalítico GGDEF (Zähringer *et al.*, 2012).

En este trabajo se decidió corroborar los fenotipos observados en las mutantes obtenidas por inserción del transposón, pero ahora empleando mutantes en las que se ha eliminado el marco de lectura correspondiente al gen que presumiblemente afectó el transposón. Las mutantes empleadas provienen de la colección Keio (Baba *et al.*, 2006) y fueron generadas empleando la metodología de Datsenko y Wanner (2000). La mutante $\Delta dgcT$ presentaba un fenotipo contrario al esperado para una DGC (formaba más biopelícula que la silvestre). Con el objeto de observar si existe algún tipo de influencia entre algunas DGCs y PDEs sobre DgcT y de explicar el fenotipo observado en ésta, se generaron mutantes curadas de la resistencia a antibiótico en diferentes DGCs y PDEs, así como dobles mutantes donde se eliminó el gen *dgcT* y alguna otra DGC o PDE. Se cuantificó la producción de biopelícula de cada una y se evaluó el efecto de las mutantes por eliminación sobre la transcripción del operón *pgaABCD*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Probar si alguno de los genes de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, bajo estudio, participa en la regulación de la síntesis de PGA.

Comprobar si existe un efecto de dobles mutaciones en *dgcT* y genes de diguanilato ciclasa o fosfodiesterasa, sobre la formación de biopelícula en *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos particulares

- Con el propósito de observar el efecto que tiene sobre la síntesis de PGA el eliminar individualmente cada uno de los genes, generar mutantes curadas de la resistencia a antibiótico para los genes *dgcT*, *dgcC*, *dgcO*, *dgcZ*, *dgcN*, *pdeL*, *pdeB*.
- Con el fin de probar si existe alguna relación entre DgcT y alguna diguanilato ciclasa o fosfodiesterasa que regule la síntesis de PGA, generar dobles mutantes donde se elimine a *dgcT* en combinación con la delección de alguno de los otros genes a estudiar.
- Hacer ensayos de cuantificación de biopelícula para determinar el efecto de las mutaciones (sencillas y dobles) sobre este fenotipo.
- Cuantificar la expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ* para conocer la influencia de cada mutación sobre la expresión del operón *pgaABCD*.

4. Hipótesis

Si una DGC está involucrada en la producción de PGA, al eliminar el gen que la codifica, disminuirán los niveles de c-di-GMP, no se promoverá la producción de PGA y bajará la producción de biopelícula con respecto a la cepa silvestre.

Si una PDE participa en la producción de PGA, al eliminar el gen que la codifica, la concentración local de c-di-GMP aumentará y con ello aumentará la formación de biopelícula comparada con la cepa silvestre.

Al eliminar *dgcT* junto con el gen de alguna DGC involucrada en la producción de PGA, los niveles de c-di-GMP disminuirán, se sintetizará menos PGA y la producción de biopelícula será menor que en la cepa silvestre.

Al eliminar *dgcT* y una PDE que participa en la regulación de la síntesis de PGA, la producción de biopelícula será similar a la cepa silvestre.

5. Método

5.1 Generación de mutantes

La cepa de *E. coli* K-12 BW25113 (*lacI^q*, *rrnB_{T14}*, Δ *lacZ_{WJ16}*, *hsdR514*, Δ *araBAD_{AH33}*, Δ *rhaBAD_{LD78}*) fue empleada para generar el banco de mutantes y por lo tanto es denominada cepa parental o silvestre (wt) a lo largo de este trabajo. Todas las mutantes sencillas Δ *dgcT::km*, Δ *dgcC::km*, Δ *dgcO::km*, Δ *dgcZ::km*, Δ *dgcN::km*, Δ *pdeL::km* y Δ *pdeB::km* fueron obtenidas de la colección Keio (Baba *et al.*, 2006). Para quitar el cassette de kanamicina insertado en el marco de lectura de cada gen se utilizó el plásmido pCP20 (Datsenko y Wanner, 2000) obteniendo así mutantes sencillas sensibles Δ *dgcT*, Δ *dgcC*, Δ *dgcO*, Δ *dgcZ*, Δ *dgcN*, Δ *pdeL* y Δ *pdeB*.

Las dobles mutantes se generaron por transducción utilizando lisados de la mutante Δ *dgcT::km* para eliminar el gen *dgcT* en cada una de la mutantes sencillas sensibles, dejando en su lugar el cassette de kanamicina. Por segunda ocasión se utilizó el plásmido pCP20 para escindir el cassette de kanamicina y de esta forma tener mutantes dobles sensibles.

5.2 Sistema para inducir la formación de biopelícula / construcción de fusión reportera

Para inducir la formación de biopelícula se utilizó el plásmido pMPMABD (Oropeza, *et al.*, 2015) el cual expresa los subdominios ABD de la histidin-cinasa RcsC bajo el control del promotor pBAD. De acuerdo con Oropeza *et al.*, (2015) existe una señalización por parte de RcsC que desreprime el operón *pgaABCD* y a su vez la formación de biopelícula. De las combinaciones de subdominios de RcsC probadas en ese trabajo, los subdominios ABD produjeron la mayor cantidad de biopelícula.

Con el objeto de generar la fusión reportera de *pgaA* con *lacZ*, se clonó la región reguladora de *pgaA* en el vector pMC1871. Posteriormente la fusión *pgaA-lacZ* se digirió con la enzima PstI para ser clonada en el plásmido pMPMABD digerido también con PstI, asegurándose de que la fusión quedó orientada convergente al marco de lectura de *rscC*; de esta manera se generó el plásmido pMPMABD *pgaA-lacZ* (Fig. 3). Todas las mutantes fueron transformadas con este plásmido para inducir la formación de biopelícula y poder medir los niveles de expresión del operón *pgaABCD* a través de la fusión reportera.

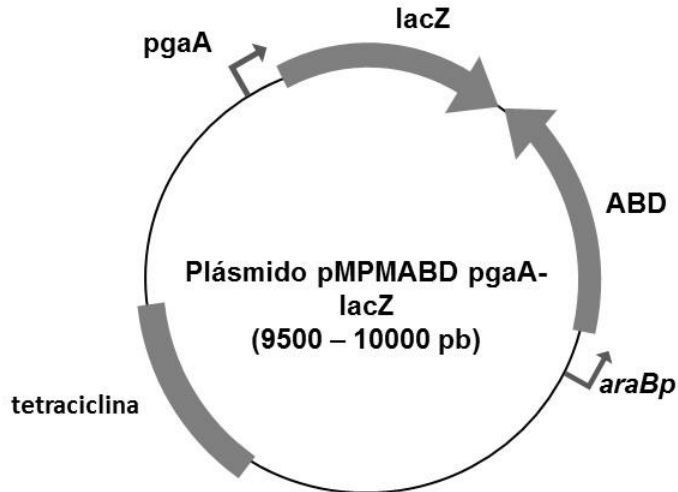


Fig. 3. Esquema del plásmido pMPMABD *pgaA-lacZ* usado para inducir formación de biopelícula. *araBp* permite inducir los dominios ABD de RcsC; con la fusión *pgaA-lacZ* es posible cuantificar los niveles de expresión del operón *pgaABCD*; el cassette de tetraciclina permite la selección de la bacterias transformadas.

5.3 Cuantificación de biopelícula

Para conocer la cantidad de biopelícula que produce cada mutante se hicieron ensayos de cuantificación de acuerdo al protocolo de Stepanovic *et al.*, (2000) con las siguientes especificaciones.

1. Se inoculó cada mutante en tubos de ensayo con 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) y 5µL de tetraciclina a 12 mg/mL, el inóculo se colocó a 37° C con agitación durante toda la noche.
2. Posteriormente se diluyó el cultivo 1:100 con medio LB al 50% y se agregó tetraciclina hasta alcanzar una concentración final de 12 µg/mL (concentración final). Con el fin de generar grupos no inducidos (no producen biopelícula) y grupos con el sistema ABD inducido (producen biopelícula) se agregó glucosa al 0.01% y arabinosa al 0.01 %.
3. Todas las muestras fueron inoculadas en placas de microtitulación de poliestireno con 200 µL en cada pozo por cuadruplicado. Cada placa fue llenada por duplicado para poder cuantificar a las 8 y 24 horas, se incubaron en condiciones estáticas y a 30°C.
4. Una vez cumplidas las 8 y 24 horas de crecimiento todas las placas fueron tratadas de la siguiente forma.
 - Para conocer la cantidad de células planctónicas se realizó una lectura de espectrofotometría a 620nm para todos los pozos.

- Se quitó el cultivo planctónico de los pozos con tres lavados de 200 μ L de PBS 1x.
- Para fijar la biopelícula se agregaron 200 μ L de metanol a cada pozo y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Se eliminó el metanol y se dejó reposando la placa hasta que se secó.
- Cada pozo fue teñido con 200 μ L de cristal violeta al 0.2% durante 10 min.
- El cristal violeta fue retirado con tres lavados de agua.
- La placa se incubó a 50°C durante 15 min para evaporar el agua.
- Se resolubilizó el cristal violeta absorbido por la biopelícula con 200 μ L de ácido acético al 33% y se leyó nuevamente con espectrofotometría, esta vez a 570nm.
- Por último y con fines de correlacionar la cantidad de células con la cantidad de biopelícula producida por éstas se hizo una relación entre ambas, dividiendo la lectura correspondiente al cristal violeta entre la lectura de células planctónicas, obteniendo así un cociente de producción de biopelícula. Debido a la sensibilidad del ensayo se tomó como referencia la cantidad de biopelícula producida por la cepa silvestre a las 24 horas en cada repetición y se le consideró como el 100% de formación de biopelícula. Se obtuvo así, de cada mutante, un valor de producción de biopelícula en porcentaje con respecto a la cantidad de biopelícula producida por la cepa silvestre a las 24 horas.

5.4 Cuantificación de la expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ*

La expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ* fue cuantificada midiendo la actividad de la enzima β -galactosidasa para saber con qué fuerza se expresa *pgaABCD* en cada mutante.

En un inicio se intentó hacer este ensayo con los cultivos en condiciones iguales a las que se crecieron las placas para la cuantificación de biopelícula (LB líquido al 50%, 30°C, en estático), sin embargo al hacer las lecturas, la actividad estaba por debajo de los niveles de detección del equipo. Debido a ello se optó por crecer a las mutantes como un tapete bacteriano en cajas Petri con medio LB sólido a 30°C durante 24 h, en presencia de arabinosa, con lo se obtuvo una mejor lectura de la actividad.

Una vez transcurridas las 24 horas de crecimiento en caja, se levantó parte de cada cultivo y se resuspendió en 300-600 μ L de amortiguador Z 1x.

Para estandarizar la cantidad de proteína con la actividad enzimática este ensayo se dividió en dos partes; cuantificación de proteínas y cuantificación de actividad β -galactosidasa. Cada una se describe a continuación incluyendo las soluciones empleadas.

- Cuantificación de proteínas en placas de poliestireno

Soluciones

Solución Ap

Sulfato de cobre (II) pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 1.69%

Solución Bp

Tartrato mixto de potasio y sodio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 3.38%

Solución Cp

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 30.8%

Hidróxido de sodio (NaOH) al 6.16%

Solución Dp

Para 100 mL se mezclaron; las soluciones Ap (1mL), Bp (1mL) y Cp (98mL)

Solución Ep

Fenol de Folin Ciocalteu's (sigma F9252) al 16.9%

Ensayo

- 1.- Se colocaron 10 μL de cada muestra por duplicado en su respectivo pozo.
- 2.- Se agregaron 100 μL de la solución Dp a cada pozo y se incubó la placa por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- 3.- Se agregaron 100 μL de la solución Ep y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación.
- 4.- Se leyó la placa a una lectura en punto final a 620 nm en el lector Biotek ELx808; las lecturas de absorbancia se correlacionaron con una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA.

- Microdeterminación de actividad β -galactosidasa

Soluciones

Solución Aa

Se mezclaron; amortiguador Z 5x (32.67 mL), betamercaptoetanol (114 μ L), se llevó esta solución a 95.6 mL añadiendo H₂O (62.81 mL). Por último se añadió triton X-100 al 10% (2.2mL) y lisozima 12mg/mL (2.2 mL).

Solución Ba

ONPG (o-nitrofenil beta D-galactopiranosido) al 0.099%

Ensayo

- 1.- Se colocaron 50 μ L de cada muestra por duplicado en sus respectivos pozos dentro de la placa.
- 2.- Se agregaron 100 μ L de la solución Aa a todos los pozos y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
- 3.- Se agregaron 100 μ L de la solución Ba a todos los pozos e inmediatamente se leyó la placa en el lector Bio-tek ELx808, programado en una lectura cinética a 415 nm durante 5 min con intervalos de lectura cada 10 seg.

La actividad específica de cada mutante se obtuvo dividiendo la actividad registrada entre la cantidad de proteína en la muestra.

5.5 Análisis estadístico

Con el objeto de saber si existen diferencias significativas entre las mutantes, para la formación de biopelícula y la fusión reportera, se realizó una prueba de U de Mann-Whitney en todos los casos comparando la media obtenida para una mutante contra la media obtenida para cualquier otra mutante, con una significancia de $p=0.05$.

6. Resultados

6.1 Ensayo de cuantificación de biopelícula

Debido a que el ensayo puede variar de acuerdo a pequeños cambios ambientales o al crecimiento celular, con la finalidad de normalizar los datos se tomó como referencia de 100% la cantidad de biopelícula que formó la cepa silvestre a las 24 horas en cada placa y se relacionó con el porcentaje que formó cada mutante. Por lo anterior, en este trabajo cada vez que se hable de porcentaje de formación de biopelícula (fb) nos referiremos al porcentaje que formó esa mutante con respecto al total formado por la silvestre en ese ensayo.

6.1.1 Inducción de biopelícula a través del promotor de arabinosa

En este trabajo al igual que en los ensayos de Oropeza *et. al.*, (2015), a través del promotor de arabinosa se activó la transcripción y acción de los dominios ABD de RcsC, induciendo así la formación de biopelícula en todas las mutantes con la producción de poly-GlcNAc. En la mayoría de los casos, la formación de biopelícula únicamente fue observada cuando se agregó arabinosa al medio (Fig. 4 A). Sin embargo en condiciones no inductoras, en presencia de 0.01% de glucosa, se encontró que la mutante $\Delta pdeB$ producía cerca de 150% fb comparado con la silvestre a las 24 h (Fig. 4 B).

6.1.2 El cassette de kanamicina altera la formación de biopelícula

Notablemente las mutantes en $\Delta dgcT:kan$ y $\Delta dgcT$ mostraron una producción de biopelícula diferencial entre ellas, 248% fb y 188 % fb respectivamente (Fig. 4 A). A nivel genético, la única diferencia, entre estas cepas es la presencia del cassette de kan que sustituye al marco de lectura de $dgcT$, lo que sugiere que la discrepancia en la producción de biopelícula es ocasionada por el contexto genómico de $dgcT$, ya que es un gen divergente con el operón $pgaABCD$, es decir, comparten región reguladora. Es probable que la inserción del cassette de kanamicina incremente la transcripción del operón aumentando, por ende, la producción de biopelícula. Sin embargo, contrariamente, la mutante $\Delta dgcT$ (ya sin el cassette de km) sigue incrementando la producción de biopelícula de forma significativa ($p=0.05$) con respecto a la silvestre, fenotipo no esperado para una mutante en una DGC. Debido a lo anterior, y a pesar de que se contaba con las versiones resistentes y sensibles a kanamicina de nuestras mutantes, se decidió enfocarse mayoritariamente en los resultados obtenidos con las mutantes sensibles para evitar cualquier efecto que pudiera ocasionar la presencia del cassette. Sin embargo, no logramos escindir el cassette en la mutante $\Delta dgcO::Kan$ por lo que en este caso no fue posible obtener datos de la mutante sensible.

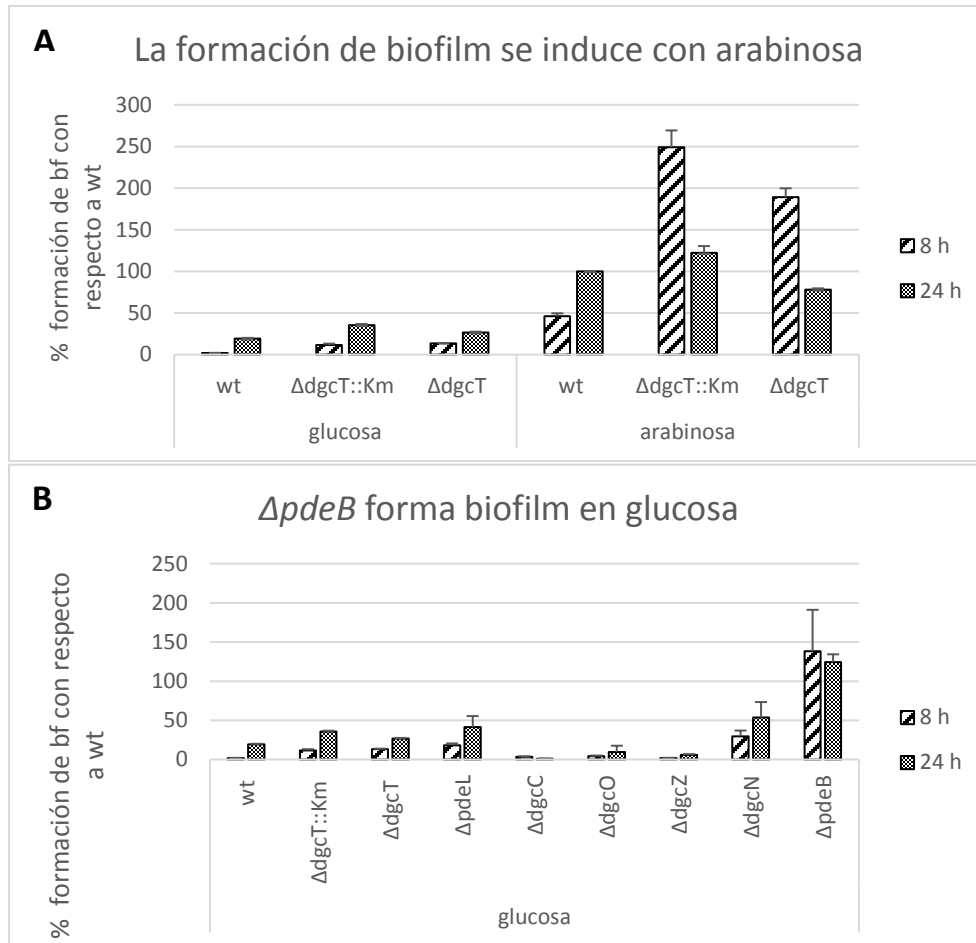


Fig. 4. A. Producción de biopelícula en las cepas silvestre (wt), $\Delta dgcT::kan$ y $\Delta dgcT$. Ambas mutantes $\Delta dgcT$ presentan niveles de producción de biopelícula más altos que la silvestre (promedio de tres repeticiones). B. $\Delta pdeB$ produce biopelícula en condiciones no inductoras, todas con glucosa (promedio de tres repeticiones).

6.1.3 Mutantes en enzimas PDE

En condiciones de inducción, la mutante $\Delta pdeL$ presentó mayor formación de biopelícula (110% fb), comparada con la wt (46% fb) a las 8 h con una diferencia significativa ($p=0.05$), mientras que a las 24 h en condiciones de inducción se observó una disminución a 77% con diferencia significativa ($p=0.05$) comparada con la silvestre (Fig. 5 A). Por otro lado, la doble mutante $\Delta pdeL/\Delta dgcT$ tuvo una producción de biopelícula significativamente mayor ($p= 0.05$) con respecto a $\Delta pdeL$ únicamente a las 24 h donde su producción de biopelícula fue 195% y 77% para cada una (Fig. 5 A). Así mismo, $\Delta pdeL/\Delta dgcT$ formó más biopelícula (8 h 97% y 24 h 195%) comparando con la cepa silvestre (8 h: 46% y 24 h: 100%) con una diferencia significativa ($p=0.05$).

Al comparar $\Delta pdeL$ con $\Delta dgcT$ se observa que los niveles de producción de biopelícula son significativamente ($p=0.05$) mayores para $\Delta dgcT$ a las 8 h (110% vs 188%). Sin embargo, a las 24 h $\Delta pdeL$ y $\Delta dgcT$ no presentan diferencias significativas ($p=0.05$).

Para el caso de $\Delta pdeB$, a las 24 h se reduce la producción de biopelícula con una diferencia significativa ($p=0.05$) respecto a wt, fenotipo no esperado para una PDE (Fig. 5 B). Por otro lado $\Delta pdeB$ presenta niveles por debajo de $\Delta dgcT$ a las 8 h (51%) y 24 h (35%) con diferencia significativa ($p=0.05$). Por su parte la doble mutante $\Delta pdeB/\Delta dgcT$ (8 h 55% y 24 h 86%) es significativamente diferente de la wt (8 h 46% y 24 h 100%) a las 8 h y 24 h, sin embargo, sus valores no son tan alejados.

Notablemente, ninguna de los dos dobles mutantes en PDE lograron alcanzar los niveles de producción de biopelícula que obtuvo $\Delta dgcT$ a las 8 h (188%); sin embargo, entre $\Delta pdeB/\Delta dgcT$ y $\Delta dgcT$ no existen diferencias significativas ($p=0.05$) a las 24 h. (Fig. 5 B)

6.1.4 Mutantes en enzimas DGC

Las mutantes $\Delta dgcC$, $\Delta dgcO$ y $\Delta dgcZ$ presentaron un porcentaje de formación de biopelícula muy reducido o casi nulo entre 0.97% y 19% (Fig. 5 C, D y E). En las dobles mutantes $\Delta dgcC/\Delta dgcT$ y $\Delta dgcZ/\Delta dgcT$, la producción de biopelícula a las 24 h se recuperó a 168% y 70%, respectivamente. En el caso de la primera los niveles estuvieron con una diferencia significativa ($p=0.05$) por arriba de la wt. Caso opuesto fue el de la mutante $\Delta dgcN$ en la que los niveles de biopelícula aumentaron (113%) con diferencia significativa ($p=0.05$) a las 8 h respecto a la silvestre pero se redujeron en la doble mutante $\Delta dgcN/\Delta dgcT$ (58%) (Fig. 5 F).

6.2 Ensayo de cuantificación de fusión reportera *pgaA-lacZ*

Al igual que en el ensayo anterior se tomó como referencia el valor de expresión que tuvo la cepa silvestre a las 24 h el cual representó el 100% en cada ensayo y se relacionó con el valor que se obtuvo de cada una de las mutantes para obtener el porcentaje correspondiente.

Concordante con los datos de cuantificación de biopelícula, la cuantificación de la actividad de reportero fue nula para todas las cepas cuando se agregaba glucosa al medio (Fig. 6 A), es decir, no se transcribía el operón *pgaABCD*. Se observó expresión del operón, únicamente cuando se agregó arabinosa al medio.

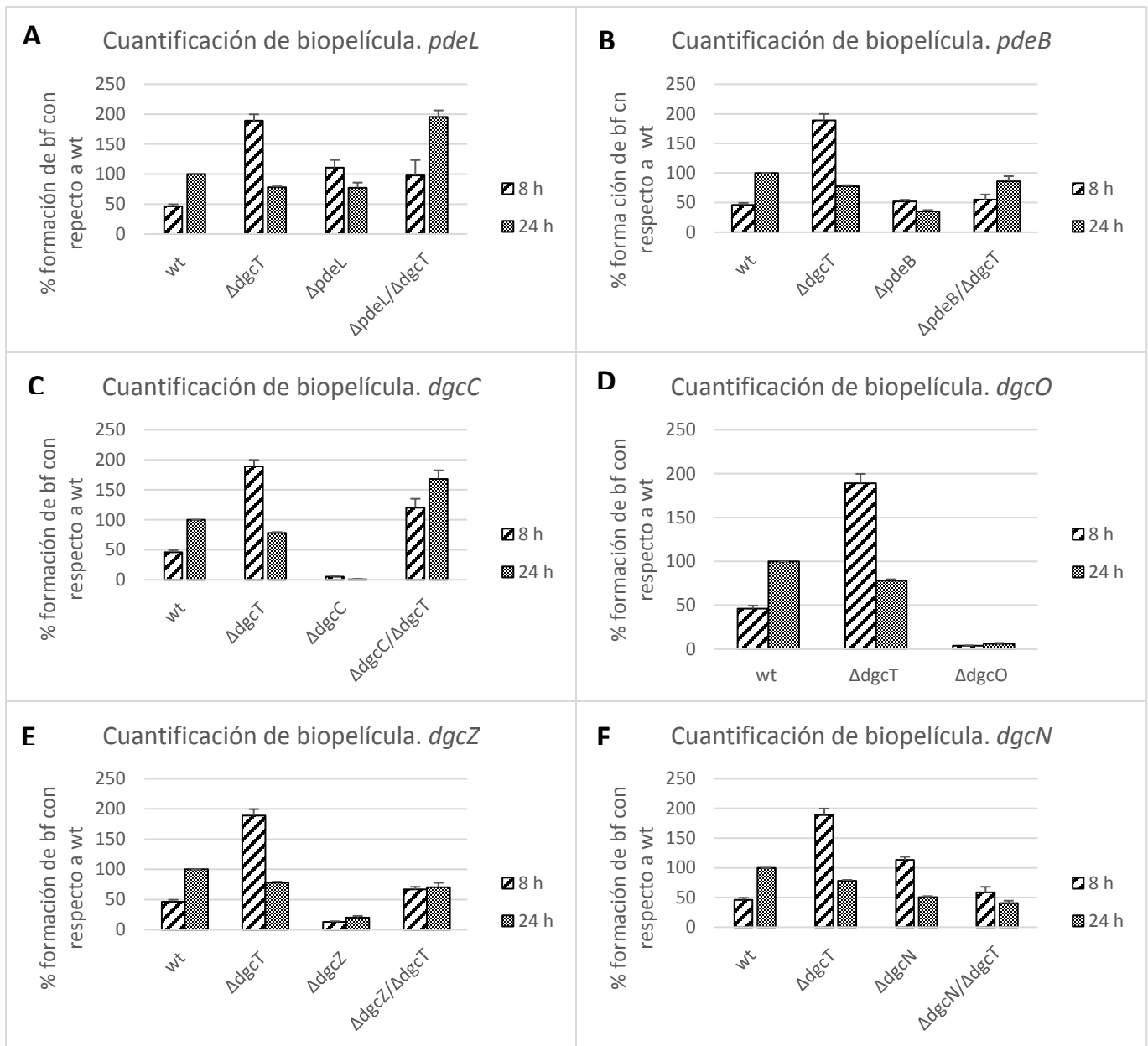


Fig. 5. Gráficos de cuantificación de biopelícula para las mutantes dobles y sencillas de A. *pdeL*, B. *pdeB*, C. *dgcC*, D. *dgcO*, E. *dgcZ* y F. *dgcN*. *dgcT* se compara con cada ensayo (promedio de tres repeticiones).

6.2.1 Nivel de transcripción del operón *pgaABCD* con el cassette de kanamicina

Las cepas $\Delta dgcT::kan$ ($\Delta dgcT::K$) y $\Delta dgcT$ mostraron diferencias significativas ($p=0.05$) en la actividad de reportero. $\Delta dgcT::K$ obtuvo 133% de expresión mientras que $\Delta dgcT$ 73% (Fig. 6 A); esta observación sugiere que la presencia del

cassette de kanamicina aumenta la transcripción del operón *pgaABCD*. Es interesante notar que existe un aumento de la transcripción en la fusión reportera. Considerando que la fusión reportera *pgaA-lacZ* se encuentra en el plásmido y a que el cassette de resistencia a kanamicina se encuentra en el cromosoma esto puede ser indicio de que el aumento en la transcripción actúa en *trans*. Probablemente la presencia del cassette o de la misma kanamicina en el medio donde se creció la mutante $\Delta dgcT::kan$ desencadena cierto estrés que promueve una respuesta para la formación de biopelícula y de alguna manera activa un factor transcripcional que se une al promotor de PGA en el plásmido, lo que aumenta su transcripción.

	Medio	8 h	24 h	Desvest 8 h	Desvest 24 h
<i>wt</i>	g	1.88	19.19	0.25	0.92
$\Delta dgcT::K$	g	11.71	35.53	1.48	1.25
$\Delta dgcT$	g	13.33	26.60	0.50	0.93
<i>wt</i>	a	46.13	100.00	3.45	0.00
$\Delta dgcT::K$	a	248.93	122.21	20.34	8.15
$\Delta dgcT$	a	189.00	77.92	10.77	1.65
$\Delta pdeL$	a	110.70	77.38	12.88	8.47
$\Delta pdeL/\Delta dgcT$	a	97.82	195.54	25.66	10.77
$\Delta pdeB$	a	51.94	35.28	2.88	2.20
$\Delta pdeB/\Delta dgcT$	a	55.10	86.22	8.68	8.54
$\Delta dgcC$	a	5.23	0.98	1.32	0.54
$\Delta dgcC/\Delta dgcT$	a	120.28	168.19	14.75	14.22
$\Delta dgcO$	a	3.83	5.99	0.46	1.05
$\Delta dgcO/\Delta dgcT$	a	nd	nd	nd	nd
$\Delta dgcZ$	a	12.87	19.88	1.18	2.95
$\Delta dgcZ/\Delta dgcT$	a	66.57	70.50	4.48	7.12
$\Delta dgcN$	a	113.46	50.53	5.11	1.74
$\Delta dgcN/\Delta dgcT$	a	58.66	40.43	9.33	4.24

Tabla 1. Cuantificación de biopelícula. Valores de Cuantificación de biopelícula para las mutantes sencillas de *dgcT*, *pdeL*, *pdeB*, *dgcC*, *dgcO*, *dgcZ* y *dgcN*; y para las dobles mutantes de *dgcT* y los otros genes bajo estudio. Con valores adimensionales por la normalización de los datos.

6.2.2 La expresión del operón *pgaABCD* se recupera en algunas dobles mutantes

Las mutaciones que tuvieron un efecto considerable sobre la expresión de operón *pgaABCD* fueron: $\Delta pdeB$, $\Delta dgcC$, $\Delta dgcO$. En los tres casos el nivel de expresión fue muy bajo (los porcentajes obtenidos con respecto a los niveles para la silvestre

fueron 0%, 0.7% y 8.3%, respectivamente). En contraste, las dobles mutantes $\Delta pdeB/\Delta dgcT$ y $\Delta dgcC/\Delta dgcT$ presentan niveles de expresión de *pgaABCD* notablemente más altos (60% y 129% para cada uno) (Fig. 6 B).

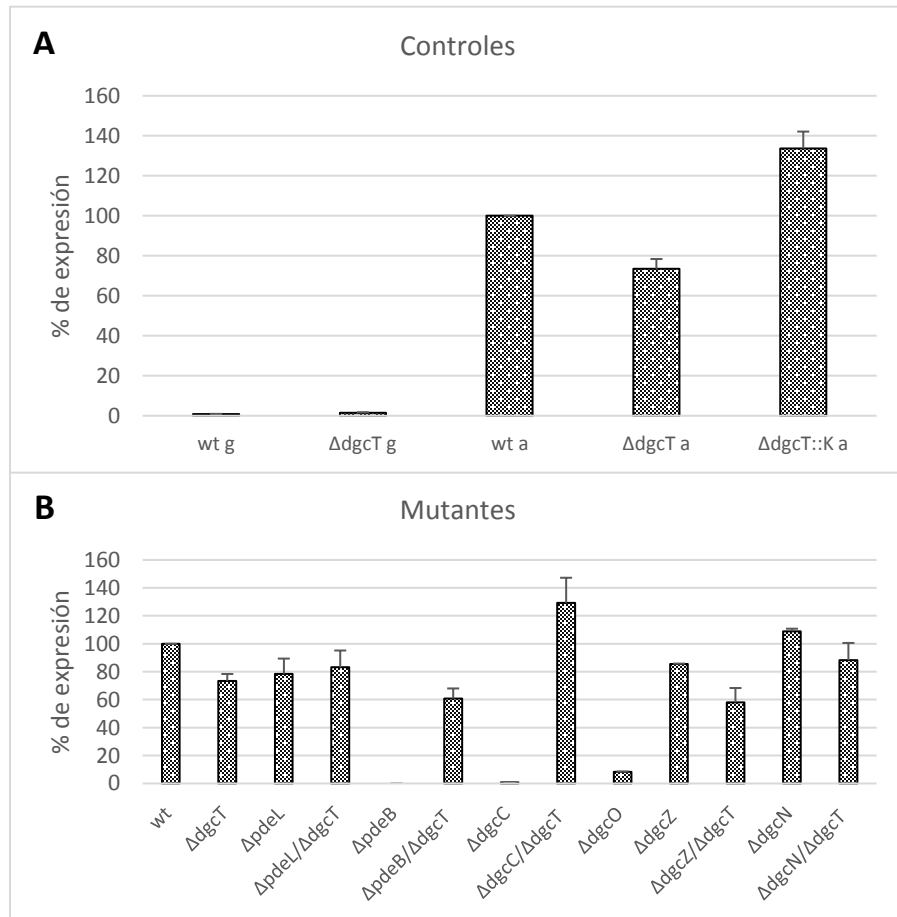


Fig. 6. Cuantificación de expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ* por medición de la actividad de la enzima β -galactosidasa, en medio sólido a 30° C. A. Cuantificación de controles, g (con glucosa) a (con arabinosa). B. Mutantes dobles y sencillas de *pdeL*, *pdeB*, *dgcC*, *dgcO*, *dgcZ*, *dgcN* y *dgcT* (todas con arabinosa).

	Medio	% de expresión	Desvest	Coeficiente
<i>wt glu</i>	g	0.78	0.16	0.21
Δ <i>dgcT::K g</i>	g	nd	nd	nd
Δ <i>dgcT g</i>	g	1.51	0.26	0.17
<i>wt a</i>	a	100.00	0.00	0.00
Δ <i>dgcT::K a</i>	a	133.66	8.46	0.06
Δ <i>dgcT a</i>	a	73.46	4.92	0.07
Δ <i>pdeL</i>	a	78.52	10.88	0.14
Δ <i>pdeL/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	83.17	12.02	0.14
Δ <i>pdeB</i>	a	0.00	0.00	0.00
Δ <i>pdeB/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	60.74	7.29	0.12
Δ <i>dgcC</i>	a	0.79	0.05	0.06
Δ <i>dgcC/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	129.34	17.92	0.14
Δ <i>dgcO</i>	a	8.38	0.21	0.02
Δ <i>dgcO/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	nd	nd	nd
Δ <i>dgcZ</i>	a	85.42	0.38	0.00
Δ <i>dgcZ/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	57.98	10.34	0.18
Δ <i>dgcN</i>	a	108.93	1.86	0.02
Δ <i>dgcN/\Delta</i> <i>dgcT</i>	a	88.23	12.36	0.14

Tabla 2. Actividad de reportero. Valores de cuantificación de expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ*, por medición de la actividad de la enzima β -galactosidasa, en medio sólido a 30° C, en los fondos silvestre y mutantes analizados en este trabajo. *"g" la mutante creció en presencia de glucosa, "a" la mutante creció en presencia de arabinosa; en las mutantes que no se especifica, fueron crecidas en presencia de arabinosa. Con valores adimensionales por la normalización de los datos.

7. Discusión

7.1 PdeL está involucrada en la producción de PGA

Al eliminar un gen de una PDE involucrada en la producción de PGA, se espera que la concentración local de c-di-GMP aumente y con ello aumente la formación de biopelícula. Contrariamente, aquellas PDEs que no tengan ningún efecto sobre la concentración del c-di-GMP que controla la síntesis de PGA, no afectarán los niveles de biopelícula en comparación con la silvestre.

Concordante al fenotipo esperado para una enzima PDE involucrada en la producción de PGA, la mutante $\Delta pdeL$ eleva la producción de biopelícula (Fig. 5 A), con una diferencia significativa respecto a la silvestre a las 8 horas de crecimiento. Lo que sugiere que PdeL forma parte de las enzimas involucradas en la regulación del c-di-GMP que controla la producción de PGA.

Otra hipótesis es que PdeL podría unirse de forma inhibitoria a otras regiones del genoma involucradas en la síntesis de la maquinaria productora de PGA o de alguna DGC. Al no estar presente podría suprimirse la represión ejercida sobre éstos y así aumentar la producción de PGA como se muestra en nuestros resultados. Lo anterior debido a que se ha reportado que esta proteína presenta un dominio de unión a DNA y actúa como factor transcripcional activando su propia expresión, uniéndose a una región río arriba de su promotor (Reinders *et al.*, 2015).

7.2 $\Delta pdeB$ presenta un fenotipo no esperado

En contraste con $\Delta pdeL$, la mutante $\Delta pdeB$ no aumentó la producción de biopelícula como se espera para una PDE involucrada en la biosíntesis de PGA, por el contrario, esta delección tuvo un efecto negativo sobre la producción de biopelícula. Lo anterior sugiere que PdeB está implicada de alguna forma en la producción de PGA. Los resultados de este trabajo apuntan a que cuando no está presente PdeB ($\Delta pdeB$) los niveles de biopelícula formada por PGA caen, condición en la que se sabe que la concentración de c-di-GMP debe ser baja.

Una forma en la que la mutante $\Delta pdeB$ podría afectar la concentración de c-di-GMP responsable de activar la producción de PGA, es a través de la inhibición de DGCs. Se sabe que muchas DGCs presentan un sitio de inhibición catalítica conocido como sitio I; éste es sensible a c-di-GMP (Povolotsky y Hengge, 2016; Hengge, 2009). Tomando en cuenta la ubicación y formación de distintas pozas de c-di-GMP (regionalización) que afectan diferentes efectores (Hengge, 2009) se sugiere la existencia de una poza de c-di-GMP bajo el control de PdeB. Esta poza podría tener la capacidad de controlar enzimas DGCs, que en conjunto forman una segunda poza de c-di-GMP directamente responsable de la producción de PGA. Al eliminar PdeB la primera poza aumentaría sus niveles de c-di-GMP inhibiendo a las DGCs reguladoras de la segunda poza, por lo que en esta disminuirían las concentraciones de c-di-GMP y la producción de PGA, como se observa en la figura 5 A de los resultados.

En la wt, se propone que PdeB afecta las concentraciones de c-di-GMP en la primer poza, en respuesta a señales ambientales. Dependiendo de la concentración de la primer poza las DGCs son activadas o no para permitir la producción de PGA. Así mismo, los resultados de este trabajo sugieren que esta primer poza también podría estar bajo el control de DgcT (se discute más adelante).

7.3 $\Delta pdeB$ produce biopelícula en condiciones no inductoras

Con la excepción de $\Delta pdeB$, todas las mutantes presentaron una formación de biopelícula mínima cuando se crecieron en condiciones no inductoras con glucosa (menores de 13% fb a las 8 h) (Fig. 4 B). De forma interesante $\Delta pdeB$ produjo más biopelícula en condiciones no inductoras (glucosa) que en condiciones inductoras (arabinosa). Por otro lado, en los ensayos de cuantificación de reportero $\Delta pdeB$ no presenta diferencias significativas con la silvestre, en el medio con glucosa (anexo 1). Es poca la información que se conoce sobre esta fosfodiesterasa, por lo que únicamente podemos predecir que este comportamiento está relacionado con alguna señal proveniente del medio con glucosa que activa la producción de biopelícula en ausencia de *pdeB*. En este trabajo no se puede asegurar que la biopelícula formada por esta mutante en medio con glucosa tenga como componente principal PGA o algún otro polímero. Este fenotipo no parece ser ocasionado por el plásmido pMPMABD ya que en el resto de las mutantes la no inducción con glucosa no produjo biopelícula y la inducción con arabinosa promovió la formación de éste.

7.4 *DgcO*, *DgcZ* y *DgcC* son importantes para la transcripción del operón *pgaABCD*

El fenotipo esperado al eliminar una diguanilato ciclasa involucrada en la producción de PGA es que disminuirán los niveles de c-di-GMP, no se promoverá la producción de PGA y por tanto bajará la producción de biopelícula con respecto a la silvestre. Este comportamiento se cumple para las mutantes $\Delta dgcC$, $\Delta dgcO$ y $\Delta dgcZ$, (Fig. 5 C, D y E) lo que indica que estas DGCs son importantes para la producción de biopelícula a través de la síntesis de PGA.

DgcO y *DgcZ* ya han sido previamente descritas como proteínas que participan en la biogénesis de PGA. A través de la producción de c-di-GMP *DgcO* estimula, de alguna manera desconocida hasta la fecha, la transcripción del operón *pgaABCD* (Tagliabue *et al.*, 2010a). Nuestros resultados muestran que en ausencia de *DgcO* la producción de biopelícula es muy baja. Así mismo se muestra que, en medio LB sólido a 30°C la ausencia de esta proteína abate la expresión del operón *pgaABCD*. Concordante con nuestros resultados Tagliabue *et al.*, 2010a, mostraron que la sobreexpresión y la inactivación de *dgcO* aumenta y afecta negativamente los niveles del transcrito de *pgaABCD*, respectivamente. En conjunto, esto sugiere que *DgcO* está involucrada en la expresión del operón *pgaABCD* y también en la producción de PGA.

Por su parte, se ha reportado que la producción de c-di-GMP por *DgcZ* estabiliza las proteínas de membrana interna *PgaD* y *PgaC* encargadas de la polimerización de PGA (Steiner *et al.*, 2013; Boehm *et al.*, 2009). En ese sentido, cabe notar que en la mutante $\Delta dgcZ$ no disminuyen los niveles de expresión del operón *pgaABCD* en nuestro ensayo, pero si disminuye la producción de biopelícula.

DgcC no había sido relacionada, previamente, con la producción de PGA. De manera interesante, la mutación $\Delta dgcC$, inhibe completamente la transcripción del operón *pgaABCD* y por ende la formación de biopelícula (Fig 5 C), (Fig 6 B). Por lo tanto, al igual que DgcO, se trata de una proteína de gran relevancia para la producción de PGA. Existen reportes sobre la regulación de *dgcC* por parte de CsgD, el cual es activado por σ_s en respuesta a estrés (Weber *et al.*, 2006). Se sabe que la biopelícula representa una protección que favorece el crecimiento bacteriano en ambientes hostiles (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Costerton *et al.*, 1999). Por lo anterior, hace entonces sentido que *dgcC* esté involucrado en la cascada de respuesta a estrés con la activación de la transcripción del operón *pgaABCD* y la regulación alostérica de la formación de biopelícula.

7.5 Las dobles mutantes $\Delta pdeB / \Delta dgcT$, $\Delta dgcC / \Delta dgcT$ recuperan la expresión del operón *pgaABCD*

Las mutaciones en *pdeB*, *dgcC* y *dgcO* abatieron por completo la expresión de la fusión reportera *pgaA-lacZ*, lo que sugiere gran importancia de estos genes para la transcripción del operón *pgaABCD*. Sin embargo, de forma interesante, las dobles mutantes $\Delta pdeB / \Delta dgcT$, $\Delta dgcC / \Delta dgcT$ recuperan la expresión del operón (Fig. 6 B). Lo anterior parece indicar que DgcT estaría reprimiendo de alguna forma la transcripción del operón *pgaABCD* en ausencia de PdeB o DgcC, al no estar presente DgcT, en las dobles mutantes, esta posible represión se perdería permitiendo así la transcripción de *pgaABCD*.

7.6 DgcT y PdeB podrían estar controlando algunas DGCs y PDEs a través de las concentraciones de c-di-GMP

En las mutantes $\Delta dgcC$ y $\Delta dgcO$ la expresión de la fusión *pgaA-lacZ* y la cantidad de biopelícula se reducen considerablemente. En $\Delta dgcZ$ los niveles de producción biopelícula son nulos, estas observaciones sugieren que el c-di-GMP producido por las proteínas codificadas en estos genes afecta la producción de PGA de la forma propuesta por el paradigma de la regulación por c-di-GMP: cuando la concentración de éste disminuye, las bacterias optan por un estado planctónico de crecimiento. De forma contrastante en las dobles mutantes $\Delta dgcC / \Delta dgcT$ y $\Delta dgcZ / \Delta dgcT$ la formación de biopelícula se recupera. Muchas DGCs tienen un sitio de inhibición que une c-di-GMP conocido como sitio I. Una explicación a lo observado es que DgcT podría estar alimentando los niveles de c-di-GMP de una primer poza que controla a varias DGCs (entre ellas, pero no exclusivamente, a DgcC, DgcO y DgcZ) y las inhibe a través de su sitio I (Fig. 7). Entonces, cuando DgcT no está, la poza podría no tener suficiente c-di-GMP para inhibir a las DGCs y estas estarían activas aumentando la producción de c-di-GMP y en consecuencia de PGA. Las dobles mutantes sustentan mejor esta hipótesis, el incremento en la producción de biopelícula en éstas podría ser resultado de que al no estar DgcT nuevamente no existen concentraciones suficientes para inhibir las

DGCs y estas se activan, situación que no ocurre en la mutante sencilla donde estando DgcT presente puede inhibir al resto de las DGCs.

Por otro lado PdeB parece jugar un papel similar al propuesto para DgcT, controlando los niveles de c-di-GMP de la poza primaria o reguladora de DGCs. Esto a razón de que el fenotipo esperado para $\Delta pdeB$ es que incremente la producción de biopelícula y el resultado obtenido es que disminuye. Posiblemente PdeB actúa disminuyendo los niveles de c-di-GMP de la poza para activar las DGCs; al eliminar PdeB la concentración de c-di-GMP no baja lo suficiente para activar a un grupo de DGCs. Entonces, se sugiere que PdeB podría disminuir los niveles de c-di-GMP permitiendo, en cierto grado, la no inhibición de DGCs y en consecuencia la producción de PGA (caso de la wt). En ausencia de PdeB la concentración de c-di-GMP no disminuye al grado en que ocurre en la wt; las DGCs no son activadas tanto como lo son en la wt y producen una menor cantidad de PGA y biopelícula. En este trabajo se sugiere la existencia de dos grupos de DGCs: (1) DGCs de efecto indirecto que regulan la concentración de c-di-GMP de la primer poza, (2) DGCs de efecto directo que son reguladas por la primer poza a través de su sitio I e influyen en las concentraciones de c-di-GMP de la segunda poza (Fig. 5). Se sugiere que DgcT se encuentra dentro de las DGCs de efecto indirecto, no obstante no se descarta la existencia de otras DGCs pertenecientes a este grupo. El grupo de DGCs de efecto directo estaría conformado por DgcC y DgcO sin descartar la existencia de otras DGCs no estudiadas en este trabajo.

Las mutantes $\Delta dgcT$ y $\Delta pdeB$ dieron un fenotipo no esperado para una DGC y una PDE, respectivamente, en relación a la formación de biopelícula. Fenotipos opuestos a lo esperado para DGCs y PDEs han sido reportados en otros trabajos (Ha *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2010; Kulasakara *et al.*, 2006; Hoffman *et al.*, 2005), no obstante pocas explicaciones se han dado al respecto.

Hoffman y colaboradores reportaron en 2005 que Arr (“aminoglycoside response regulator”), una PDE de *Pseudomonas aeruginosa*, promueve la formación de biopelícula, la explicación de estos autores se basa en la localización específica de Arr en la membrana, lo cual le permite regular la formación de biopelícula a través de apéndices de superficie como el pili. La posibilidad de que PdeB pueda promover la formación de biopelícula a través de apéndices de superficie no puede ser descartada; sin embargo, el hecho de que la mutante $\Delta pdeB$ repirma por completo la transcripción de *pgaABCD* apunta a que PdeB regula este operón.

Por su parte Ryan y colaboradores en 2010 reportaron un par de DGCs (XC_0249 y XC_0420) en *Xanthomonas campestris* que regulan de forma positiva la motilidad, contrario a lo supuesto para una DGC. Al igual que en este trabajo los autores sugieren la existencia de pozas discretas de c-di-GMP que pueden ser generadas y actuar de una manera altamente localizada. Sin embargo, también explican que XC_0249 y XC_0420 tienen contacto físico con la PDE RpfG; este

contacto podría estar estimulando la actividad de PDE e inhibiendo la de DGC. En este trabajo no se hicieron pruebas de interacción proteína-proteína, sin embargo la presencia de sitios de inhibición sensibles a c-di-GMP en todas las DGCs estudiadas sugiere una regulación mediante este nucleótido.

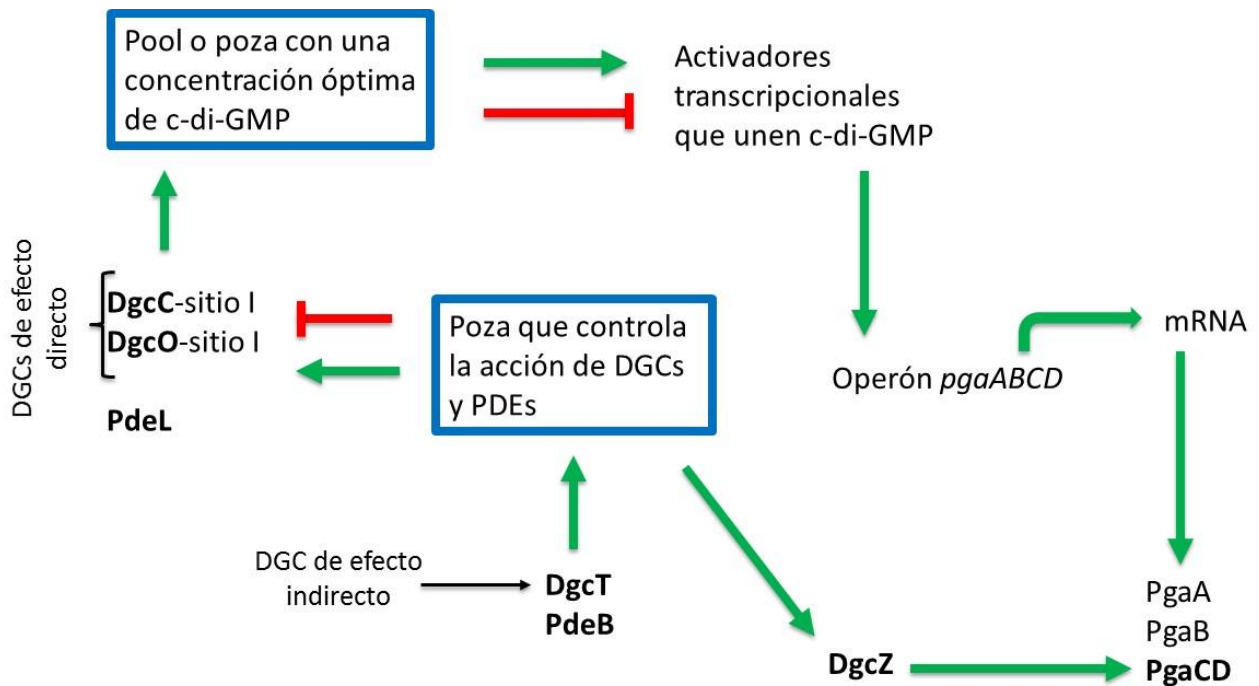


Fig. 7. Modelo integrativo que incluye las PDEs y DGCs estudiadas en este trabajo. Se propone la existencia de dos pozas de c-di-GMP, la primera es controlada por DgcT y PdeB y regula la actividad de DgcC y DgcO, las cuales junto con PdeL regulan la concentración de c-di-GMP de la segunda poza responsable de activar los factores transcripcionales para el operón *pgaABCD*. Una vez que las proteínas del operón se traducen producirán PGA. La interacción de PgaC y PgaD se verá favorecida por el c-di-GMP producido por DgcZ como ya ha sido reportado (Boehm *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2013).

7.7 Los resultados para DgcN no permiten colocarla dentro del modelo propuesto

La mutante $\Delta dgcN$ no cumple con la hipótesis para una DGC ya que aumenta la biopelícula a las 8 h respecto a la silvestre, esto podría sugerir que DgcN controla la primer poza propuesta, sin embargo, la doble mutante $\Delta dgcN/\Delta dgcT$ no se ajusta a este supuesto ya que se esperaría que la producción de biopelícula aumentara debido a que la concentración de c-di-GMP en la primer poza sería muy baja al no estar DgcN ni DgcT.

Con la metodología utilizada en este trabajo no fue posible encontrar claramente en qué parte del modelo propuesto encaja DgcN. Como se mencionó anteriormente *dgcN* (*yfiN*) es parte del operón *yfiBNR*. DgcN se encuentra anclada a la membrana interna y es activa de forma dimérica. Se ha demostrado que YfiR es una proteína periplásmica capaz de reprimir la actividad de DgcN impidiendo la formación de dímeros. Por su parte YfiB es una lipoproteína que se encuentra anclada a la membrana externa (Xu *et al.*, 2016). En respuesta a estrés su conformación dimérica se estira e incrementa su afinidad por péptido glicano; esto propicia que la porción C-terminal penetre en la pared celular y secuestre a YfiR, permitiendo así que DgcN forme dímeros y sea activa (Xu *et al.*, 2016; Malone *et al.*, 2010). El funcionamiento de las proteínas codificadas en el operón *yfiBNR* depende de la presencia de las tres y al no estar DgcN probablemente se altera la interacción de las restantes y se genera una respuesta que tiene un efecto sobre PGA. Sin embargo en el caso de esta mutante los resultados no nos permiten comprender la forma en que DgcN regula la producción de PGA.

7.8 La producción de biopelícula se reduce a las 24 h en algunos ensayos

En las mutantes $\Delta dgcT$, $\Delta dgcN$, $\Delta pdeB$ y $\Delta pdeL$ se observa que la biopelícula se reduce al comparar los niveles a las 8 h contra las 24 h para la misma mutante. Esta reducción puede ser atribuida al crecimiento celular en demasía dentro del pozo de la placa de poliestireno. Una vez que la biopelícula comienza la fase de dispersión y los nutrientes comienzan a escasear las bacterias pueden verse obligadas a consumir la biopelícula y reducir los niveles de éste. Así mismo se sabe que las distintas fases de formación de biopelícula no tienen un tiempo definido de duración por lo que podría ocurrir un desfaseamiento de las diferentes etapas en los ensayos.

8. Conclusiones

DgcO, DgcC y PdeL regulan, a través de la síntesis y ruptura de c-di-GMP, la transcripción del operón *pgaABCD*. Las deleciones de los genes correspondientes a cada una de estas proteínas dieron un fenotipo esperado para DGC y PDE, respectivamente. Es posible que existan reguladores transcripcionales de *pgaABCD* los cuales responden a los niveles de c-di-GMP generados en conjunto por PdeL, DgcC y DgcO.

Para explicar los resultados obtenidos con las mutantes sencillas y dobles mutantes se propone un modelo en donde DgcT y PdeB controlan las concentraciones de c-di-GMP de una primer poza en respuesta a diferentes señales ambientales. Dependiendo de la concentración de c-di-GMP en esta poza, se regula, a través del sitio I, la actividad de DgcO, DgcC y posiblemente otras DGCs no estudiadas en este trabajo, las cuales a su vez controlan la

concentración de c-di-GMP en una segunda poza que regula la activación de factores transcripcionales del operón *pgaABCD*.

Es importante tener en mente que no hay evidencia experimental directa de la existencia de las dos pozas sugeridas, sin embargo, esta hipótesis, se ajusta bien a los resultados obtenidos en este trabajo y nos ayuda a explicar el fenotipo no esperado en $\Delta dgcT$.

DgcN está implicada en la biogénesis de PGA, sin embargo, es necesario estudiar la influencia del operón *yfiBNR* completo sobre la síntesis de PGA.

9. Perspectivas

Como perspectivas de este trabajo quedan:

- Comprobar la existencia de las dos pozas sugeridas.
- Buscar qué factores transcripcionales son regulados por la segunda poza de c-di-GMP.
- Generar la mutante $\Delta dgcO/\Delta dgcT$ para comprobar el efecto de DgcO sobre la segunda poza.
- Evaluar la existencia de otras DGCs y PDEs involucradas en la regulación de c-di-GMP en las pozas.
- Estudiar la relación del operón *yfiBNR* con la biogénesis PGA.

10. Literatura citada

- Baba T, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, KA. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner y H. Mori (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. No. 2006.0008. Doi:10.1038/msb4100050.
- Benziman M., P. Ross, H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel y J. H. van Boom (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*. Vol 325: 279-281.
- Bobrov A. G., O. Kirillina, S. Forman, D. Mack y R. D. Perry (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environmental Microbiology*. No. 10:1419–1432. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x.
- Boehm A., S. Steiner, F. Zaehring, A. Casanova, F. Hamburger, D. Ritz, W. Keck, M. Ackermann, T. Schirmer y U. Jenal (2009). Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress.

- Molecular Microbiology. Vol. 72: 1500–1516. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06739.x.
- Brombacher E., A. Baratto, C. Dorel y P. Landini (2006). Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesión. *Journal of Bacteriology*. Vol. 188, No. 6:2027–2037. doi:10.1128/JB.188.6.2027–2037.
 - Costerton J. W., S. S. Philip y E. P. Greenberg (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. Vol. 284: 1318-1322.
 - Datsenko K. A. y Wanner B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. vol. 97. No. 12: 6640 – 6645. Doi: 10.1073/pnas.120163297.
 - Flemming H. C. y Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol 8: 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
 - Gupta P., S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee y P. Tribedi (2015). Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*. Doi: 10.1007/s00203-015-1148-6.
 - Ha Dae-Gon, M. E. Richman y G. A. O’Toole (2014). Deletion Mutant Library for Investigation of Functional Outputs of Cyclic Diguanylate Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 80. No. 11: 3384 –3393.
 - Hengge R, Galperin MY, Ghigo J-M, Gomelsky M, Green J, Hughes KT, Jenal U y Landini P. (2016). Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domaincontaining cyclic di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 198: 7–11. doi:10.1128/JB.00424-15.
 - Hengge R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol 7: 263-273. doi:10.1038/nrmicro2109.
 - Hoffman L. R., D. A. D’Argenio, M.J. MacCoss, Z. Zhang, R. A. Jones y S. I. Miller (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature Letters*. Vol 436: 1171-1175. |Doi:10.1038/nature03912.
 - Hurlow J., K. Couch, K. Laforet, L. Bolton, D. Metcalf y P. Bowler (2015). Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in wound care*. Vol. 4. No.5: 295-301. doi: 10.1089/wound.2014.0567.
 - Itoh Y., J. D. Rice, C. Goller, A. Pannuri, J. Taylor, J. Meisner, T. J. Beveridge, J. F. Preston III y T. Romeo (2008). Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm sdhesin Poly-β-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine. *Journal of Bacteriology*. Vol. 190, No. 10. doi:10.1128/JB.01920-07.
 - Jenal U. (2004). Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary Messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 7: 185–191. doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.007.

- Jonas K., A. N. Edwards, R. Simm, T. Romeo, U. Römling y Ö. Melefors (2008). The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, Vol. 1. No.70: 236–257. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06411.x
- Kim H. K. y Harshey R. M. (2016). A diguanylate cyclase acts as a cell division inhibitor in a two-step response to reductive and envelope stresses. *mBio* 7(4):e00822-16. doi:10.1128/mBio.00822-16.
- Kulasakara H., V. Lee, A. Brencic, N. Liberati, J. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, A. N. Neely, M. Hyodo, Y. Hayakawa, F. M. Ausubel y S. Lory (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *PNAS*. Vol. 103. No. 8: 2839 –2844.
- Mah T.F., y O'Toole, G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. No. 9: 34–39.
- Malone J. G., T. Jaeger, C. Spangler, D. Ritz, A. Spang, C. Arrieumerlou, V. Kaefer, R. Landmann y U. Jenal (2010). YfiBNR Mediates Cyclic di-GMP Dependent Small Colony Variant Formation and Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogen*. Vol. 6. Issue 3 : e1000804. doi:10.1371/journal.ppat.1000804.
- Martínez L. C. y Vadyvaloo V. (2014). Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. *Celular and infection microbiology*. Vol. 4. Article 38 doi:10.3389/fcimb.2014.00038.
- Nikolskaya A. N., A. Y. Mulkidjanian, I. B. Beech y M. Y. Galperin (2003). MASE1 and MASE2: Two Novel Integral Membrane Sensory Domains *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. No. 5:11–16. Doi: 10.1159/000068720.
- Oglesby L., S. Jain y D. E. Ohman (2008). Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*. No. 154: 1605–1615. doi: 10.1099/mic.0.2007/015305-0.
- Oropeza R., R. Salgado-Bravo y E. Calva. Deletion analysis of RcsC reveals a novel signalling pathway controlling poly-N-acetylglucosamine synthesis and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*. No. 161: 903–913. Doi: 10.1099/mic.0.000050.
- Povolotsky T. L. y Hengge R. (2012). “Life-style” control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second messenger c-di-GMP. *Journal of Bacteriology*. Vol 198. No.1: 111–126. doi:10.1128/JB.00520-15.
- Povolotsky T. L. y Hengge R. (2016). Genome-based comparison of cyclic di-GMP signaling in pathogenic and comensal *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*. No. 198:111–126.doi:10.1128/JB.00520-15.
- Reinders A., C. S. Hee, S. Ozaki, A. Mazur, A. Boehm, T. Schirmer y U. Jenal (2015). Expression and Genetic Activation of Cyclic Di-GMP-Specific

Phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. No. 198: 448–462. doi:10.1128/JB.00604-15.

- Römling U., M. Y. Galperin y M. Gomelsk (2013). Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 77. No. 1: 1–52. doi:10.1128/MMBR.00043-12.
- Römling, U., M. Rohde, , A. Olsén, , S. Normark, y J. Reinköster (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*. No. 36:10–23. doi 10.1046/j.1365-2958.2000.01822.x.
- Ryan R.P., Y. McCarthy, M. Andrade, C. S. Farah, J. P. Armitage y J. M. Dow (2010). Cell–cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *PNAS*. Vol. 107. No. 13: 5989–5994.
- Sanchez-Torres V., H. Hu y T. K. Wood (2011). GGDEF Proteins YeaI, YedQ, and YfiN Reduce Early Biofilm Formation and Swimming Motility in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. No. 90(2): 651–658. doi:10.1007/s00253-010-3074-5.
- Steiner S., C. Lori, A. Boehm y U. Jenal (2013). Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein–protein interaction. *The European Molecular Biology Organization Journal*. Vol. 32. No. 3: 354-368.
- Stepanovic S., D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic y M. Svabic-Vlahovic (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. No. 40: 175–179.
- Stoodley H. L., J. W. Costerton y P. Stoodley (2004). Bacterial Biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol. 2: 95-108. doi:10.1038/nrmicro821.
- Stoodley P., K. Sauer, D. G. Davies y J. W. Costerton (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. No. 56: 187–209. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- Sundriyal A, C. Massa, D. Samoray, F. Zehender, T. Sharpe, U. Jenal y T. Schirmer. (2014). Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *Journal of Biological Chemistry*. No. 289: 6978– 6990. doi: 10.1074/jbc.M113.516195.
- Tagliabue L., D. Antoniani, A. Maciag, P. Bocci, N. Raffaelli y P. Landini (2010a). The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic pgaABCD operon. *Microbiology*. No. 156: 2901–2911. Doi:10.1099/mic.0.041350-0.

- Tagliabue L., A. Maciag, D. Antoniani y P. Landini (2010b). The *yddV*-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. FEMS Immunology and Medical Microbiology No. 59: 477–484.
- Tamayo R., J.T. Pratt y A. Camilli (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. Annual Review of Microbiology. No. 61: 131–148. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093426.
- Tuckerman J. R., G. Gonzalez, E. H. Sousa, X. Wan, J. A. Saito, M. Alam y M. A. Gilles-Gonzalez (2009). An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. Biochemistry. No. 48:9764–9774. Doi: 10.1021/bi901409g.
- Wang X., J. F. Preston III y T. Romeo (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. Journal of bacteriology. Vol. 186, No. 9: 2724–2734. Doi: 10.1128/JB.186.9.2724–2734.
- Weber H., C. Pesavento, A. Possling, G. Tischendorf y R. Hengge (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05440.x.
- Zähringer F., Lacanna, U. Jenal, T. Schirmer y A. Boehm (2013). Structure and Signaling Mechanism of a Zinc-Sensory Diguanylate Cyclase. Cell Press. Structure 21:1149–1157. Doi: 10.1016/j.str.2013.04.02.
- Zogaj X., M. Nitz, M. Rohde, W. Bokranz y U. Römling (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Molecular Microbiology. No. 39: 1452–1463. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x.

11. Anexos

1.

Cuantificación de Biofilm					
Mutante	% de formación de biofilm		Desviación Estandar		Medio
	Media 8 hr	Media 24 hr	8 hr	24 hr	
wt	1.88186494	19.19183768	0.24884648	0.91799895	g
Δ dcT::K	11.7092037	35.53051017	1.48297918	1.24924349	g
Δ dcT	13.3280765	26.60346872	0.50303941	0.9263608	g
Δ pdeL/ Δ dcT::K	6.08268216	25.62006875	0.62686837	2.11081403	g
Δ dcC/ Δ dcT::K	1.45849124	6.511312307	0.05294083	1.37542931	g
Δ dcO/ Δ dcT::K	1.14827458	5.252692235	0.52765255	0.90377012	g
Δ dcZ/ Δ dcT::K	1.13679857	3.860773082	0.73009758	1.673992	g
Δ dcN/ Δ dcT::K	5.90374434	15.24525508	0.08459439	2.21471804	g
Δ pdeB/ Δ dcT::K	5.42693962	34.76001941	1.61784738	2.62474965	g
wt	46.1265989	100	3.45494027	1.0049E-14	a
Δ dcT::K	248.930787	122.2117926	20.343013	8.14548882	a
Δ dcT	188.998503	77.92174825	10.7718137	1.64639086	a
Δ pdeL/ Δ dcT::K	260.25279	306.6640166	17.9323766	3.94044965	a
Δ dcCC/ Δ dcT::K	110.240398	218.0378599	15.3582329	11.8586246	a
Δ dcO/ Δ dcT::K	192.659772	174.1157875	6.98881625	16.3401434	a
Δ dcZ/ Δ dcT::K	40.9497837	54.31456308	8.63656228	7.65961462	a
Δ dcN/ Δ dcT::K	323.560182	249.935275	17.2041525	12.9989874	a
Δ pdeB/ Δ dcT::K	94.0183227	122.4649526	8.58284123	2.60988275	a
Δ pdeL	18.148276	41.31259102	2.39435549	14.1597939	g
Δ dcC	3.5950469	0.810174722	0.5256566	0.43008015	g
Δ dcO	4.30758329	9.422001939	0.77928867	8.17958553	g
Δ dcZ	1.73378727	5.887285209	0.44832176	0.97906876	g
Δ dcN	29.705977	53.50702698	7.26989429	19.8454328	g
Δ pdeB	138.284735	124.2147475	52.8040048	10.089176	g
Δ pdeL	110.702174	77.37575367	12.8813593	8.46665544	a
Δ dcC	5.23075452	0.975058067	1.3180754	0.53673631	a
Δ dcO	3.82844771	5.992707934	0.46394741	1.04831058	a
Δ dcZ	12.8671238	19.87570424	1.17926868	2.94500526	a
Δ dcN	113.462091	50.53384048	5.11364074	1.74180512	a
Δ pdeB	51.9351057	35.27871546	2.88268544	2.19842278	a
Δ pdeL/ Δ dcT	8.23085978	17.99589783	1.8814871	5.47846036	g
Δ dcC/ Δ dcT	2.02973205	22.99578202	0.80267472	0.93012819	g
Δ dcO/ Δ dcT					
Δ dcZ/ Δ dcT	1.87459772	3.955450486	0.59585094	0.57678581	g
Δ dcN/ Δ dcT	1.11737031	2.446600222	0.06232532	0.4119178	g
Δ pdeB/ Δ dcT	8.61351728	25.8537951	5.06928943	6.91319403	g
Δ pdeL/ Δ dcT	97.8229479	195.5382814	25.6576545	10.7723096	a
Δ dcC/ Δ dcT	120.281395	168.1926265	14.7499635	14.2247274	a
Δ dcO/ Δ dcT	nd	nd	nd	nd	
Δ dcZ S/ Δ dcT	66.5661287	70.50142424	4.48064349	7.11645105	a
Δ dcN/ Δ dcT	58.656242	40.42541339	9.32801887	4.23847802	a
Δ pdeB S/ Δ dcT	55.1014073	86.22375039	8.6838027	8.53931816	a

2.

Cuantificación de fusión reportera <i>pgaA-LacZ</i>			
	% de expresión		
Mutante	Media	Desviación Estandar	Medio
wt	0.782337197	0.162344429	g
Δ dgT::K	nd		g
Δ dgT	1.505242752	0.258829417	g
Δ pdeL/ Δ dgT::K	0.666196152	0.77217837	g
Δ dgC/ Δ dgT::K	0.911527418	0.812437025	g
Δ dgO/ Δ dgT::K	1.448101478	1.256147035	g
Δ dgZ/ Δ dgT::K	1.918435426	1.45584726	g
Δ dgN/ Δ dgT::K	0	0	g
Δ pdeB/ Δ dgT::K	0.359802616	0.623196411	g
wt	100	6.35529E-15	a
Δ dgT::K	133.6596056	8.456405859	a
Δ dgT	73.46379834	4.924926429	a
Δ pdeL/ Δ dgT::K	81.83243692	10.21688214	a
Δ dgC/ Δ dgT::K	185.6537212	12.57737539	a
Δ dgO/ Δ dgT::K	66.37351698	9.260108882	a
Δ dgZ/ Δ dgT::K	59.65956351	6.578965787	a
Δ dgN/ Δ dgT::K	99.4436573	6.129130479	a
Δ pdeB/ Δ dgT::K	91.95473806	8.689607705	a
Δ pdeL	1.562684411	1.410577083	g
Δ dgC	1.114620495	0.945369375	g
Δ dgO	1.942391173	1.37074006	g
Δ dgZ	2.120430385	0.590808705	g
Δ dgN	0.417515508	0.477462437	g
Δ pdeB	0.130947845	0.226808321	g
Δ pdeL	78.52181039	10.88254079	a
Δ dgC	0.790428981	0.050883363	a
Δ dgO	8.380194556	0.208657519	a
Δ dgZ	85.42432928	0.38275468	a
Δ dgN	108.9349423	1.864606133	a
Δ pdeB	0	0	a
Δ pdeL/ Δ dgT	0.771365161	1.269740038	g
Δ dgC/ Δ dgT	0.663659151	0.617452779	g
Δ dgO/ Δ dgT			
Δ dgZ/ Δ dgT	1.015688699	1.476424323	g
Δ dgN/ Δ dgT	0.46585303	0.806881116	g
Δ pdeB/ Δ dgT	0	0	g
Δ pdeL/ Δ dgT	83.16710522	12.01992869	a
Δ dgC/ Δ dgT	129.3415886	17.91661959	a
Δ dgO/ Δ dgT	nd	nd	
Δ dgZ/ Δ dgT	57.98203037	10.343076	a
Δ dgN/ Δ dgT	88.22512109	12.36163883	a
Δ pdeB/ Δ dgT	60.74433956	7.286680081	a