



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**Estudio del papel del segundo mensajero bis-(3' –5')-ácido
diguanílico cíclico (c-di-GMP) en el metabolismo de
*Escherichia coli***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Q.F.B. MICAELA MARCELA MÉNDEZ ORTIZ

TUTOR: DR. JORGE MEMBRILLO HERNÁNDEZ



BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F.

FEBRERO, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo es un proyecto original generado en el laboratorio del Dr. Jorge Membrillo Hernández, quien dirigió mis estudios de doctorado y esta tesis en el Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

DEDICATORIAS

A Jorge mi esposo, por todo tu amor, tu apoyo, tu compañía, porque existo para ti y te amo por sobre todas las cosas.

A mi núcleo familiar, Queta mi mami que siempre me cuida, me apapacha y me consiente; a mis hermanas Rosy y Sara porque siempre hemos estado juntas; a todas las amo.

A la memoria de Arturo mi papi y Amado mi abuelito, porque sé que me cuidan desde donde están.

A toda mi familia veracruzana, mi adorada abuelita y todas mis tías, tíos, primas, primos y todos los demás.

A todas mis amigas y amigos que siempre están al pendiente de mí, especialmente a Regina, Ariadna, Kenia, Carol, Flor y Marcela.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor principal, el Dr. Jorge Membrillo Hernández, por darme la oportunidad de realizar el doctorado bajo su asesoría y porque es un privilegio trabajar con él, porque comparte sin reservas su conocimiento, porque su laboratorio es un lugar donde lo más importante es la formación de los alumnos, porque no escatima en darnos su tiempo y porque hace hasta lo imposible por proporcionarnos las mejores condiciones de trabajo y las mejores oportunidades de aprender y superarnos.

A mi Comité Tutorial, Dra. Maluye Girard Cuesy, Dr. Mario Soberón Chávez y Dr. Jaime Martínez Salazar por toda la asesoría que me proporcionaron a lo largo de mis estudios de doctorado, por sus conocimientos y comentarios y porque siempre tuvieron la mejor disposición en ayudarme para sacar adelante mi trabajo de investigación.

A mi Jurado de tesis, Dr. Edmundo Calva, Dr. Jorge Membrillo, Dra. Gloria Soberón, Dra. Ma. Lourdes Girard, Dr. Sergio Encarnación, Dr. Mario Soberón y Dr. José Luis Puente, por las ideas y comentarios que me proporcionaron para mejorar este trabajo y por el tiempo que dedicaron a su revisión.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme una beca para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por otorgarme una beca complementaria para mis estudios de Doctorado.

Al Proyecto de Apoyo a Estudiantes de Posgrado de la UNAM, por otorgarme un apoyo económico para la compra de algunos reactivos y la realización de los microarreglos.

A los donativos IN205200 y IN207703 del programa PAPIIT-UNAM que financiaron este proyecto.

A los donativos J33369 y 42580 de CONACYT que financiaron este proyecto.

A la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A la organización de las Gordon Research Conferences y a la Dra. Patricia J. Kiley por otorgarme la “Carl Storm Fellow”.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha L. Contreras Zentella por su valiosa ayuda en múltiples experimentos, pero más importante que eso, por su apoyo, amistad y consejos.

Al Dr. Edgardo Escamilla Marván por permitirme realizar experimentos en su laboratorio.

Al Dr. Juan Luis Pacheco, por su ayuda en la realización de los experimentos de HPLC y por su amistad y a David Zamorano por su amistad, ambos enriquecen mi trabajo con sus comentarios.

A la Dra. Laura Camarena y al Dr. Sebastián Poggio por asesorarme y permitirme realizar los análisis de microscopía óptica en su laboratorio.

Al Dr. Miguel Angel Ramírez del Centro de Ciencias Genómicas por su invaluable y desinteresada ayuda.

Al Sr. Miguel Paéz por su apoyo en la elaboración de medios, es un privilegio contar con su ayuda, porque su trabajo es sinónimo de calidad y por estar siempre de buen humor.

Al Técnico Académico Rodolfo Paredes de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en los análisis de Microscopía Electrónica.

A la Dra. Ute Romling del Karolinska Institutet, a Dr. Jean Marc Ghigo y Dr. Christophe Beloin del Institute Pasteur por las cepas que amablemente nos proporcionaron.

Al Dr. Yoshihiro Hayakawa de la Universidad de Nagoya, Japón, por proporcionarnos el estándar de c-di-GMP.

A los miembros del laboratorio del Dr. Membrillo Hernández.

PUBLICACIONES

Méndez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Membrillo-Hernández, J. Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* (2006), 281:8090-8099. Anexo 1.

Méndez-Ortiz, M. M., Chávez-Pacheco, J. L., Ramírez-Romero, M. A., Contreras-Zentella, M. L., Escamilla, E. and Membrillo-Hernández, J. Transcriptional regulation and mutagenesis of the *yddV-dos* operon involved in the control of the intracellular levels of the second messenger c-di-GMP in *Escherichia coli* K-12. A genetic and genome wide transcriptional profile analysis. (2006). Enviado a *Microbiology*. Anexo 2.

Méndez-Ortiz, M. M. y Membrillo-Hernández, J. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *TIP Rev. Esp. C. Quím. -Biol.* (2004), 7:26-34. Anexo 3.

Méndez-Ortiz, M. M. y Membrillo-Hernández, J. Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano. *Rev. Lat. Microbiol.* (2005), 47:130-139. Anexo 4.

Colón-González, M., **Méndez-Ortiz, M. M.** and Membrillo-Hernández, J. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Res. Microbiol.* (2004), 155:514-521. Anexo 5.

PUBLICACIONES QUE CITAN ESTE TRABAJO

- 1.- Romling, U., Amikam, D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* (2006). 9:218-28.
- 2.- Jenal, U., Malone, J. Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* (2006). 40:385-407.
- 3.- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., Jenal, U. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* (2006). 281:32015-32024.
- 4.- Jonas, K., Tomenius, H., Romling, U., Georgellis, D., Melefors, O. Identification of YhdA as a regulator of the *Escherichia coli* carbon storage regulation system. *FEMS Microbiol. Lett.* (2006). 264:232-237.
- 5.- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., Hengge, R. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (2006). 62:1014-1034.
- 6.- Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* (2006). 9:445-53.
- 7.- O'Shea, T.M., Klein, A.H., Geszvain, K., Wolfe, A.J., Visick, K.L. Diguanylate cyclases control magnesium-dependent motility of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* (2006). 188:8196-8205.
- 8.- Takahashi, H. and Shimizu, T. Phosphodiesterase activity of *Ec* DOS, a heme-regulated enzyme from *Escherichia coli*, toward 3'-5'-cyclic diguanylic acid is obviously enhanced by O₂ and CO binding. *Chem. Lett.* (2006). 35: 970-971.

9.- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Dow, J.M. Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J. Bacteriol.* (2006). 188: 8327-8334.

10.- Lim, B., Beyhan, S., Yildiz, F.H. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* (2007). 189: 717-729.

11.- Cabellos-Avelar, T., Souza, V., Membrillo-Hernández, J. Spent media from cultures of environmental isolates of *Escherichia coli* can suppress the deficiency of biofilm formation under anoxic conditions of laboratory *E. coli* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* (2006). 58:414-424.

CONGRESOS

Asistencia al **EMBO Workshop in Molecular Microbiology** “Prokaryotes in the Third Millennium” Heidelberg, Alemania. Abril, 2002.

Méndez-Ortiz, M. M. and Membrillo-Hernández, J. “Transcriptional analysis of *dos* coding for an oxygen sensor with a phosphodiesterase domain (EcDos) and partial characterisation of a *dos* null mutant in *Escherichia coli*”. **EMBO Workshop in Molecular Microbiology** “Exploring prokaryotic diversity”. Heidelberg, Alemania. Abril, 2004.

Méndez-Ortiz, M. M. and Membrillo-Hernández, J. “The operon *yddV-dos* encodes for GGDEF and GGDEF-EAL proteins involved in biofilm formation and cellular division”. **Gordon Research Conference: Molecular Mechanisms of Microbial Adhesion**. Newport, RI. USA. Agosto, 2005.

Asistencia al congreso **Biofilms II** “Attachment and Detachment in pure and mixed cultures”. Leipzig, Alemania. Marzo, 2006.

Méndez-Ortiz, M. M. y Membrillo-Hernández, J. “Altas concentraciones del Segundo mensajero c-di-GMP afectan la división celular de *Escherichia coli*”. **Congreso Nacional de Microbiología**. Oaxtepec, Mor. Marzo, 2006. *Premio al Mejor Cartel en Biología Molecular*.

Méndez-Ortiz, M. M. and Membrillo-Hernández, J. “Transcriptional analysis of the operon *yddV-dos* from *Escherichia coli* that codes for GGDEF and EAL domain containing proteins”. **Gordon Research Conference: Bacterial Stress Responses**. South Hadley, MA. USA. Julio, 2006. *Carl Storm Fellow*.

Méndez-Ortiz, M. M. and Membrillo-Hernández, J. “Transcriptional analysis of the operon *yddV-dos* from *Escherichia coli* that codes for GGDEF and EAL domain containing proteins”. “**ESF-EMBO Bacterial Networks-** Joining the Strengths of Structural- and Systems Biology to reach ‘Synthetic’ Biology”. Sant Feliu de Guixols, España. Octubre, 2006.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
Abstract	3
Abreviaturas	4
Capítulo 1. Introducción General	
1.1 <i>Escherichia coli</i> como modelo de estudio	5
1.2 Transducción de señales en bacterias	5
1.3 El segundo mensajero c-di-GMP	8
1.4 Regulación de la síntesis de celulosa en otras bacterias	10
1.5 Dominios GGDEF y EAL	14
1.6 Papel de las proteínas con dominios GGDEF y EAL en el metabolismo de bacterias	20
1.7 Objetivo de esta tesis	34
Capítulo 2. Materiales y Métodos	
2.1 Cepas empleadas en este estudio	35
2.2 Plásmidos empleados en este estudio	37
2.3 Oligonucleótidos empleados en este estudio	38
2.4 Medios de cultivo empleados en este estudio	39
2.5 Condiciones de cultivo	41
2.6 Técnicas básicas de Biología Molecular	41
2.7 Técnicas básicas de Bioquímica empleadas	68
2.8 Otras técnicas	73
Capítulo 3. Antecedentes del estudio del operón <i>yddV-dos</i> de <i>E. coli</i> y de las proteínas codificadas en estos genes	75

Capítulo 4. Regulación transcripcional de los genes *yddV* y *dos* de *E. coli*

4.1 Antecedentes	79
4.2 Estrategia	79
4.3 RT-PCR del operón <i>yddV-dos</i>	79
4.4 Expresión del operón <i>yddV-dos</i>	82
4.5 Determinación del inicio de la transcripción del operón <i>yddV-dos</i>	89
4.6 Discusión	91
4.7 Conclusiones	92

Capítulo 5. Efecto fisiológico de la mutagénesis del gen *dos* y del operón *yddV-dos*. Efecto en el perfil de expresión en crecimiento aeróbico y anaeróbico de *E. coli*

5.1 Antecedentes	94
5.2 Estrategia	94
5.3 Mutación del gen <i>dos</i>	95
5.4 Mutación del operón <i>yddV-dos</i>	105
5.5 Discusión	110
5.6 Conclusiones	111

Capítulo 6. Estudio del efecto de altos niveles de c-di-GMP en la fisiología de *E. coli* y en su perfil transcripcional

6.1 Antecedentes	113
6.2 Estrategia	113
6.3 Sobreexpresión del gen <i>yddV</i> por inducción con IPTG	114
6.4 Determinación de c-di-GMP en células sobreproductoras de YddV	114
6.5 Acumulación de c-di-GMP por la sobreproducción de YddV	116
6.6 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en el nado	118
6.7 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la formación de biofilm	119
6.8 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la producción de fimbrias y celulosa	120
6.9 Microscopía óptica y electrónica de células sobreproductoras de c-di-GMP	123

6.10 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la transcripción de genes de <i>E. coli</i>	126
6.11 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la transcripción del operón <i>yddV-dos</i>	129
6.12 Discusión	130
6.13 Conclusiones	132
Capítulo 7. Discusión General	133
Capítulo 8. Perspectivas	139
Referencias	141
Anexo 1	
Anexo 2	
Anexo 3	
Anexo 4	
Anexo 5	

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Número de copias de los dominios GGDEF y EAL presentes en algunas bacterias	16
Tabla 2. Cepas empleadas	36
Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo	37
Tabla 4. Fórmula para la preparación de medio LB	39
Tabla 5. Fórmula para la preparación de medio mínimo	40
Tabla 6. Suplementos para ensayos con rojo congo	40
Tabla 7. Fórmula del buffer de carga para electroforesis de DNA	51
Tabla 8. Soluciones empleadas en los ensayos de Southern blot	64
Tabla 9. Fórmula para la preparación de un gel de poliacrilamida al 9 %	69
Tabla 10. Fórmula para la preparación de un gel de poliacrilamida al 5 %	69
Tabla 11. Fórmula del buffer colorante Laemmli para geles de proteínas	70
Tabla 12. Secuencias de los dominios GGDEF y EAL de las proteínas YddV y Dos de <i>E. coli</i> y Dgc1 y PdeA1 de <i>G. xylinus</i>	78
Tabla 13. Condiciones para las reacciones de PCR en el experimento de 5'-RACE	90
Tabla 14. Alineamiento de secuencias -10 de operones regulados por σ^S	92

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Segundos mensajeros presentes en bacterias	7
Figura 2. Estructura química del c-di-GMP	8
Figura 3. Síntesis de celulosa en <i>G. xylinus</i>	10
Figura 4. Estructura química de la celulosa	10
Figura 5. Reacciones involucradas en la síntesis de celulosa bacteriana	11
Figura 6. Asociación de los dominios GGDEF y EAL con otros dominios de señalización en bacterias	19
Figura 7. Procesos en los que el c-di-GMP potencialmente participa como segundo mensajero	20
Figura 8. Organización modular de las proteínas Dgc1 y PdeA1 de <i>G. xylinus</i>	21
Figura 9. Estructura cristalina de la proteína PleD de <i>C. crescentus</i>	23
Figura 10. Mecanismo de acción de la enzima PleD de <i>C. crescentus</i>	24
Figura 11. Morfología de células de <i>Vibrio cholerae</i> en estado no virulento y virulento	27
Figura 12. Proteínas de <i>E. coli</i> que tienen los dominios GGDEF y/o EAL	32
Figura 13. Grupos funcionales que interactúan en una purificación de DNA por columna	45
Figura 14. Obtención de cDNA a partir de RNA puro	49
Figura 15. Protocolo esquematizado del experimento de 5'-RACE	51
Figura 16. Regiones reguladoras empleadas para la construcción de las fusiones transcripcionales con el gen reportero <i>lacZ</i> para el análisis de expresión de los genes <i>yddV</i> y <i>dos</i>	57
Figura 17. PCR de las zonas promotoras para la construcción de las fusiones transcripcionales con el gen reportero <i>lacZ</i>	57
Figura 18. Diagrama de la construcción de fusiones transcripcionales con el gen reportero <i>lacZ</i>	58
Figura 19. Construcción del fragmento L-kan-R en el plásmido pUC18	59
Figura 20. Digestión de los plásmidos con la construcción L-kan-R	60

Figura 21. Esquema general de una mutagénesis por recombinación homóloga empleando las funciones λ -Red	61
Figura 22. Esquema del sistema de capilaridad empleado para Southern blot	62
Figura 23. Construcción del plásmido pYddV	65
Figura 24. Selección de las clonas de <i>yddV</i>	66
Figura 25. Análisis de digestión de los plásmidos pYddV1 y pYddV4 con una o dos enzimas de restricción	67
Figura 26. Expresión de las fusiones Φ (<i>cydA-lacZ</i>) y Φ (<i>lldP-lacZ</i>) en el fondo genético $\Delta dos::kan$	75
Figura 27. Esquema de los dominios de las proteínas PdeA1 y Dgc1 de <i>G. xylinus</i> y las proteínas Dos y YddV de <i>E. coli</i>	76
Figura 28. Zonas donde alinean los oligonucleótidos empleados en el experimento de RT-PCR	80
Figura 29. Productos de PCR obtenidos a partir de DNA cromosomal	80
Figura 30. Productos de RT-PCR	81
Figura 31. Expresión de las fusiones <i>lacZ</i> en condiciones de crecimiento aeróbico	82
Figura 32. Expresión de las fusiones <i>lacZ</i> en condiciones de crecimiento anaeróbico	83
Figura 33. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento aeróbico en medio LB	84
Figura 34. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento aeróbico en MM glicerol y LB glucosa	85
Figura 35. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético <i>rpoS::tet</i>	86
Figura 36. Secuencias de unión a los reguladores ArcA y Fnr en la región promotora del operón <i>yddV-dos</i>	87
Figura 37. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético <i>arcA::tet</i>	87
Figura 38. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético <i>fnr::Cm</i>	88
Figura 39. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en condiciones de estrés oxidativo	89
Figura 40. Identificación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>yddV-dos</i>	90
Figura 41. Caracterización molecular por PCR de las mutantes 1 y 4 ($\Delta dos::kan$)	95
Figura 42. Southern blot de las mutantes $\Delta dos::kan$ en el fondo genético JC7623	96

Figura 43. Southern blot de las mutantes $\Delta dos::kan$ en el fondo genético JC7623 empleando como sonda el casete de resistencia a kanamicina	97
Figura 44. Caracterización molecular por PCR de las mutantes $\Delta dos::kan$	97
Figura 45. Cinética de crecimiento aeróbico de la mutante $\Delta dos::kan$ en medio LB y MM Glu 0.2%	98
Figura 46. Cinética de crecimiento anaeróbico de la mutante $\Delta dos::kan$ en medio LB y MM Glu 0.2%	98
Figura 47. A) Southern blot de la transductante $\Delta dos::kan$ en la cepa W3110. B) Formación de biofilm de las cepas W3110 silvestre y mutante $\Delta dos::kan$	99
Figura 48. Fenotipos de las cepas de <i>E. coli</i> , TOB1, Fec 10 y Fec12, productoras de “curli” y celulosa	100
Figura 49. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, en crecimiento aeróbico	101
Figura 50. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, en crecimiento anaeróbico	101
Figura 51. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, cultivadas con calcoflúor	102
Figura 52. Microscopía óptica de células de la cepa MC4100 y de su respectiva mutante $\Delta dos::kan$	102
Figura 53. Viabilidad de las cepas MC4100 silvestre y $\Delta dos::kan$	104
Figura 54. Análisis de Southern blot de las mutantes $\Delta yddV-dos::kan$ en el fondo genético de la cepa MG1655	106
Figura 55. Cinética de crecimiento de las cepas MG1655 silvestre y $\Delta yddV-dos::kan$	107
Figura 56. Microscopía óptica de la cepa MG1655 silvestre y $\Delta yddV-dos::kan$	108
Figura 57. Genes inducidos y reprimidos en la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ en crecimiento aeróbico	109
Figura 58. Genes inducidos y reprimidos en la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ en crecimiento anaeróbico	110
Figura 59. Sobreproducción de la proteína YddV	114
Figura 60. Análisis de la producción de c-di-GMP por HPLC	116

Figura 61. Cinética de producción de c-di-GMP	117
Figura 62. Efecto de un incremento en la concentración de c-di-GMP en el nado	118
Figura 63. Efecto de la sobreproducción de c-di-GMP en la formación de biofilm	120
Figura 64. Crecimiento de células de la cepa TOB1 de <i>E. coli</i> en placas de LB suplementadas con rojo congo en sobreproducción de c-di-GMP	121
Figura 65. Fluorescencia de derivados de la cepa TOB1 de <i>E. coli</i> en placas de LB suplementadas con calcoflúor en sobreproducción de c-di-GMP	121
Figura 66. Cinética de crecimiento de las cepas MG1655 con el vector pSE420 y con el plásmido pYddV	123
Figura 67. Microscopía óptica de células que tienen el vector pSE420 y el plásmido pYddV	124
Figura 68. Microscopía óptica en aumento 600X de células que sobreexpresan la proteína YddV en los fondos genéticos MG1655, MC4100, W3110 y TOB1	125
Figura 69. Microscopía electrónica de transmisión de células que sobreproducen c-di-GMP	126
Figura 70. Perfil transcripcional de células con altos niveles de c-di-GMP	127
Figura 71. Actividad β -galactosidasa de la fusión Φ (<i>yddV-lacZ</i>) en condiciones de alto c-di-GMP	129
Figura 72. Actividad β -galactosidasa de la fusión Φ (<i>yddV-lacZ</i>) en condiciones de alto c-di-GMP	130
Figura 73. Reacciones generales de la síntesis e hidrólisis de c-di-GMP	136
Figura 74. Genes regulados por los factores transcripcionales SoxS, Fur y RcsA que también son regulados por niveles altos de c-di-GMP	137

RESUMEN

La disponibilidad de las secuencias de múltiples genomas bacterianos ha permitido estudiar la presencia de dominios proteicos comunes para muchas especies bacterianas. Recientemente se han descrito los dominios GGDEF y EAL los cuales han sido identificados como los responsables de las funciones de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa de c-di-GMP, respectivamente. Estos dominios se encuentran ampliamente distribuidos en bacterias pero no en arqueas ni en eucariotes.

El c-di-GMP es un segundo mensajero propio de bacterias que originalmente se descubrió como un activador alostérico de la celulosa sintasa en la bacteria *Gluconacetobacter xylinus*. Posteriormente el c-di-GMP ha sido involucrado en la producción de celulosa en otras bacterias, así como en la modificación de la superficie celular que le permite regular la formación de biopelículas, la motilidad y la virulencia entre otros procesos bacterianos. *Escherichia coli*, el modelo de estudio de este trabajo, tiene en su genoma genes que codifican para 19 proteínas con dominios GGGDEF y 17 proteínas con dominios EAL.

Este trabajo presenta el análisis del operón *yddV-dos* que codifica para una diguanilato ciclasa (YddV) y una fosfodiesterasa de c-di-GMP (Dos). El análisis transcripcional del operón *yddV-dos* muestra que es un bicistrón que se expresa principalmente en fase estacionaria, en condiciones de crecimiento aeróbico y sólo tiene un inicio de la transcripción. La mutación del gen *dos*, así como del operón completo no presenta un fenotipo evidente; sin embargo, la sobreproducción de la proteína YddV da como resultado la acumulación del segundo mensajero c-di-GMP en la célula por acción de la actividad de diguanilato ciclasa de esta proteína. A su vez, tiene como consecuencias la modificación de la matriz extracelular lo que da lugar a una mayor producción de componentes extracelulares como celulosa y “curli” (también conocido como fimbria agregativa), así como a la disminución de la motilidad y a deficiencias en la división celular dando lugar a estructuras filamentosas que alcanzan longitudes de hasta 15 μm .

El análisis del perfil transcripcional de células que sobreproducen c-di-GMP mostró que la expresión de 196 genes se modifican, principalmente de genes que codifican para proteínas de función desconocida, reguladores transcripcionales y genes que codifican para probables proteínas de membrana.

Por otro lado, el análisis transcripcional global de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ en condiciones de crecimiento aeróbico muestra que muchos de los genes cuya expresión se modifica, codifican para proteínas de metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, pero la mayoría son de función desconocida. Esto mismo sucede con los genes cuya expresión se modificó en condiciones de crecimiento anaeróbico.

ABSTRACT

The availability of multiple bacterial genome sequences has led to the discovery of several conserved domains of proteins. Recently, GGDEF and EAL domains have been described as domains responsible for the diguanylate cyclase (c-di-GMP synthase) and c-di-GMP specific phosphodiesterase activities respectively. These domains are not found in *archaea* or *eucarya*.

C-di-GMP, a second messenger in bacteria, was first discovered as an allosteric activator of the cellulose synthase in *Gluconacetobacter xylinus*, and recently it has been identified as a global regulator of several processes such as biofilm formation, motility and virulence, presumably through a modification of the cell surface properties. *Escherichia coli* K-12 bears 12 proteins with a GGDEF domain, 10 with an EAL domain and 7 with both domains, however, their physiological role is still unknown.

In the present work, we show the analysis of the operon *yddV-dos* that codes for a diguanylate cyclase (YddV) and a c-di-GMP phosphodiesterase (Dos). The transcriptional analysis of *yddV-dos* operon provided evidence that indeed it is a bicistronic operon expressed mainly at the stationary phase of aerobic growth in an RpoS dependent manner. Only one transcriptional start site was found under all conditions tested. Disruption of the gene *dos* or the complete operon does not present a distinguishable phenotype, however, over expression of YddV, renders an accumulation of intracellular c-di-GMP, leading to a modification of the extra cellular matrix (production of “curli” and cellulose), and also a decrease in motility and cellular division.

The transcriptional profile analysis of cells with high levels of c-di-GMP showed that 196 genes were modified in expression, mainly, genes that code for proteins of unknown function, transcriptional regulators and putative membrane proteins. On the other hand, the transcriptional profile analysis of the $\Delta yddV-dos::kan$ mutant in aerobic growth conditions showed that most of the genes that changed their expression, code for proteins involved in aminoacid and carbohydrate metabolism and proteins of unknown function.

ABREVIATURAS

cAMP	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ppGpp	3'-difosfato-5'-difosfato de guanosina
c-di-GMP	bis-(3',5')-ácido diguanílico cíclico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecilsulfato de sodio
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
kb	kilopares de bases
pb	pares de bases
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosido
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
D.O.	densidad óptica
kDa	kilo Dalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
rpm	revoluciones por minuto

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 *Escherichia coli* como modelo de estudio

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa, Gram negativa, que coloniza el intestino de vertebrados, pero que también sobrevive cuando es liberada al medio ambiente. *E. coli* es clasificada como una γ -proteobacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y ha sido el modelo de estudio para muchos procesos esenciales de la vida, debido a que es un organismo de rápido crecimiento y de requerimientos nutricionales simples y además, se han desarrollado herramientas bioquímicas, genéticas y moleculares que facilitan su estudio.

Algunas cepas de *E. coli* han sido estudiadas en detalle. *E. coli* K-12 MG1655 fue la primera cepa cuyo cromosoma fue secuenciado. Tiene un único cromosoma circular, con 4,639,221 pb y 4,288 genes que codifican para proteínas. De estos genes, el 38% no tiene alguna función asignada. El genoma de *E. coli* K-12 tiene 50.8% de contenido de G+C. Los genes que codifican para proteínas constituyen el 87.8% del genoma, los genes que codifican para RNA estable es el 0.8%, el 0.7% consta de secuencias repetidas no codificantes y el resto del genoma corresponde a secuencias reguladoras y de otras funciones (1).

1.2 Transducción de señales en bacterias

1.2.1 Sistemas de dos componentes

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de transducción de señales para responder a los cambios ambientales. En esencia, la transducción de señales es la conversión del reconocimiento de una señal hacia la activación de una respuesta celular. Entre los sistemas de transducción de señales se encuentran los sistemas de dos componentes, que actúan a través de lo que se conoce como relevo de fosfatos.

Se ha demostrado que los sistemas de dos componentes en bacterias, regulan una variedad de respuestas celulares que incluyen la osmoregulación, la quimiotaxis, la esporulación, la producción de antibióticos y la patogenicidad entre otros (2). Estos sistemas están constituidos por una proteína cinasa, la cual consiste de un dominio de reconocimiento de la señal, acoplado a un dominio de autofosforilación (autocinasa). La detección de la señal por esta autocinasa resulta en la hidrólisis de ATP y la fosforilación de un residuo de histidina, en un sub-dominio de fosfotransferasa en la autocinasa. Este sub-dominio de fosfotransferasa está acoplado específicamente al dominio regulador de una proteína, llamada regulador de respuesta, a la cual se le transfiere el grupo fosforilo resultando en un grupo aspartil-fosfato. La función del regulador de respuesta es activar la respuesta apropiada al estímulo recibido. En la mayoría de los casos, la respuesta es la activación transcripcional de genes cuyos productos contienen o responden ante una señal molecular dada, aunque otro tipo de enzimas o dominios pueden ser controlados de esta manera (3). Esta vía de señalización también incluye una fosfatasa, que defosforila al regulador de respuesta, regresándolo a su estado no estimulado y habilitándolo nuevamente para responder a la señal. La fosfatasa puede ser la histidina cinasa misma, el regulador de respuesta, o bien, otra proteína por separado. Las histidina cinasas residen por lo general en la membrana pero también pueden encontrarse en el citoplasma, mientras que los reguladores de respuesta están en el citoplasma (3,4).

1.2.2 Segundos mensajeros

Existe otra forma de transducción de señales en las bacterias y es el caso de los segundos mensajeros. Los segundos mensajeros son moléculas de bajo peso molecular, empleadas en la transducción de señales para retransmitir o potenciar una señal en la célula. El segundo mensajero más estudiado en *Escherichia coli* y en otras bacterias es la molécula monofosfato de adenosina cíclico (AMPc, Fig.1), la cual es una molécula de bajo peso molecular que, entre muchas funciones, se une al factor transcripcional Crp. La bacteria *E. coli* posee la capacidad de elegir, de una mezcla de fuentes de carbono diferentes, a aquélla que le permite crecer más rápidamente. La molécula AMPc y su proteína receptora Crp forman parte de un sistema que responde a los niveles y al tipo de fuente de carbono

presente en el medio, constituyendo uno de los mecanismos relacionados a la represión catabólica. Se ha determinado experimentalmente que el complejo Crp-AMPC se une a las regiones promotoras de alrededor de una docena de operones. En la gran mayoría de los casos estudiados, el complejo Crp-AMPC funciona como activador transcripcional (5).

Otro segundo mensajero en bacterias es la molécula tetrafosfato de guanidina (ppGpp, Fig.1), que se produce en respuesta a la limitación de nutrientes, principalmente, en escasez de aminoácidos o de fuente de carbono y en circunstancias que detienen el crecimiento bacteriano. Las enzimas responsables de la síntesis de esta molécula en bacterias Gram negativas son RelA y SpoT. El ppGpp se une directamente a las unidades β y β' de la RNA polimerasa y afecta una variedad de funciones fisiológicas, principalmente la transcripción de genes relacionados con el crecimiento, con la respuesta a estrés y con la respuesta a la falta de nutrientes. Adicionalmente, este segundo mensajero, también llamado molécula de alarma, reprime la síntesis de RNA ribosomal y actúa como un efector positivo de genes dependientes del factor σ^{70} , requeridos durante condiciones que detienen el crecimiento, la entrada a fase estacionaria y la respuesta al estrés (6).

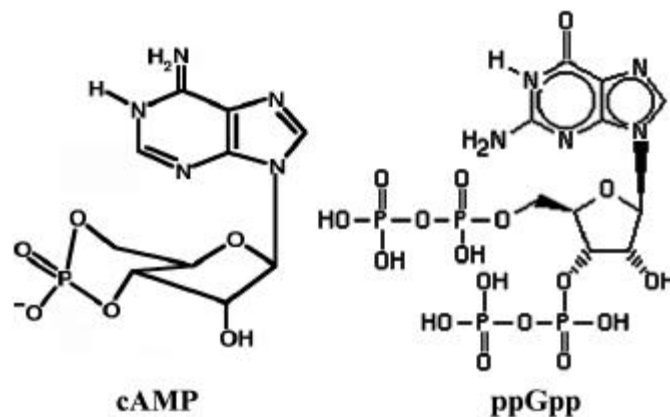


Figura 1. Segundos mensajeros presentes en bacterias.

1.3 El segundo mensajero c-di-GMP

1.3.1 La molécula c-di-GMP

Además de los segundos mensajeros anteriormente descritos, en las bacterias se encuentra al menos otra molécula clasificada como segundo mensajero, el bis-(3',5')-ácido diguanílico cíclico (c-di-GMP). Esta molécula se describió inicialmente como un activador alostérico de la enzima celulosa cintaza, en la bacteria productora de celulosa *Gluconacetobacter xylinus*. La función del c-di-GMP como molécula de señalización no se conocía sino hasta estudios recientes, en los que se le ha involucrado en diversos procesos bacterianos como la virulencia, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelículas, entre otros (7).

El c-di-GMP es un dinucleótido cíclico, que consiste de dos residuos de riboguanosina unidos por enlaces 3'-5' fosfodiéster, que forman una estructura cíclica (Fig.2). La estructura cristalina de dicha molécula muestra una columna rígida, formada por dímeros intercalados y el análisis de espectroscopia de masas sugirió un arreglo de cuatro moléculas de c-di-GMP, alineados para formar dos cuartetos de guanina paralelos con una cavidad central (8,9). El carácter ácido del c-di-GMP le permite formar sales con iones presentes en el medio, como Li^+ , Na^+ y K^+ (10).

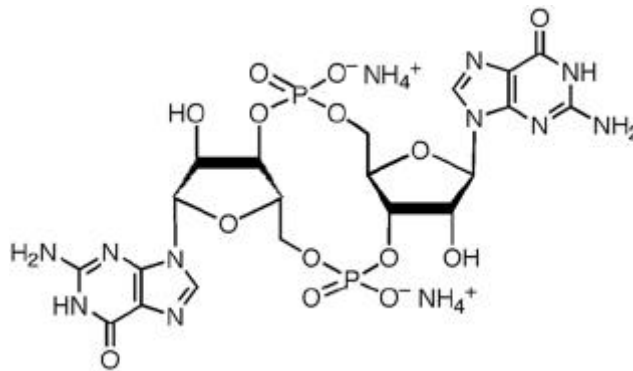


Figura 2. Estructura química del c-di-GMP.

1.3.2 c-di-GMP como regulador alostérico de la celulosa sintasa de *G. xylinus*

Como se mencionó anteriormente, el c-di-GMP se identificó por primera vez por el grupo de M. Benziman, como una molécula activadora de la enzima celulosa sintasa (CS) en la bacteria *G. xylinus*, ya que incrementa la actividad de la síntesis de este polímero de manera específica (11). La síntesis de celulosa en *G. xylinus* está a cargo de la enzima celulosa sintasa, que consta de una subunidad catalítica que se encarga de sintetizar el polímero de celulosa a partir de UDP-glucosa y una subunidad de unión a c-di-GMP, también llamada proteína de unión a c-di-GMP (CDGBP, Fig. 3, (12)).

En *G. xylinus*, la concentración intracelular de c-di-GMP se estima que es de 5-10 μM y está mediada por la acción antagonista de las enzimas diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa de c-di-GMP (PDEA). *G. xylinus* contiene tres isoenzimas de DGC y tres isoenzimas de PDEA, las cuales están codificadas en tres operones independientes. Cada una de las tres proteínas DGC (codificadas por los genes *cdg1*, *cdg2*, *cdg3*) y las tres proteínas PDEA (codificadas por los genes *pdeA1*, *pdeA2* y *pdeA3*), comparten homología en sus dominios estructurales pues cada una de ellas contiene los dominios GGDEF y EAL en las regiones del carboxilo terminal (C-terminal).

La identificación de los dominios GGDEF y EAL compartidos por las enzimas DGC y PDEA y encontrados en numerosas proteínas bacterianas de función no definida, sugiere que ambos dominios están involucrados en mecanismos de regulación conservados, que podrían estar coordinando distintas actividades requeridas en diversas proteínas, en donde el c-di-GMP está involucrado como una molécula señal (13,14). La función de estos dominios se abordará más adelante.

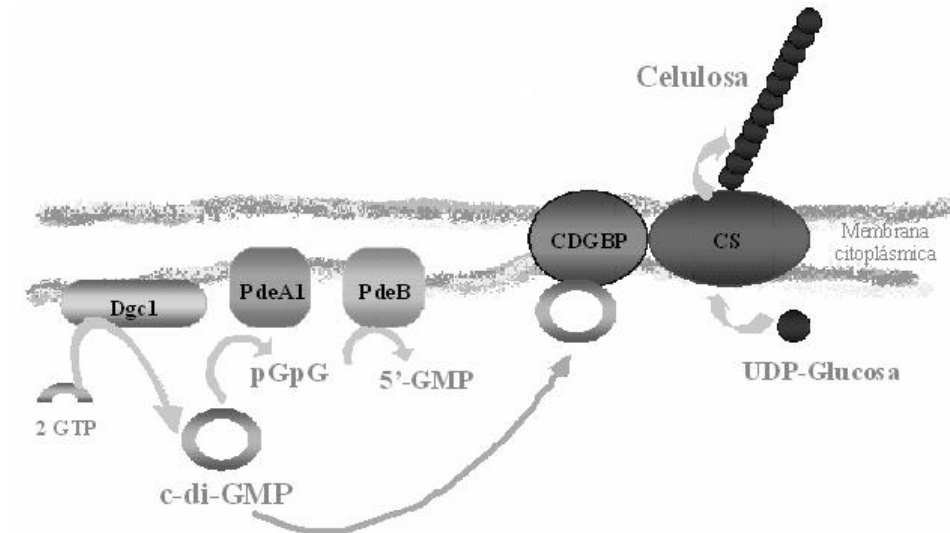


Figura 3. Síntesis de celulosa en *G. xylinus*. El c-di-GMP es sintetizado por la diguanilato ciclasa Dgc1 y se une a la subunidad CDGBP activando la síntesis de celulosa, la cual es llevada a cabo por la enzima celulosa sintasa (CS) la cual utiliza como sustrato UDP-glucosa. El c-di-GMP es degradado por la actividad de fosfodiesterasa de la enzima PdeA1.

1.4 Regulación de la síntesis de celulosa en otras bacterias

Las bacterias que producen celulosa (Fig. 4), la usan generalmente como un componente extracelular para protección de agentes mecánicos y químicos así como para facilitar la adhesión de células a tejidos huéspedes. *G. xylinus* ha sido el modelo para el estudio de síntesis de celulosa bacteriana ya que produce celulosa pura como producto extracelular.

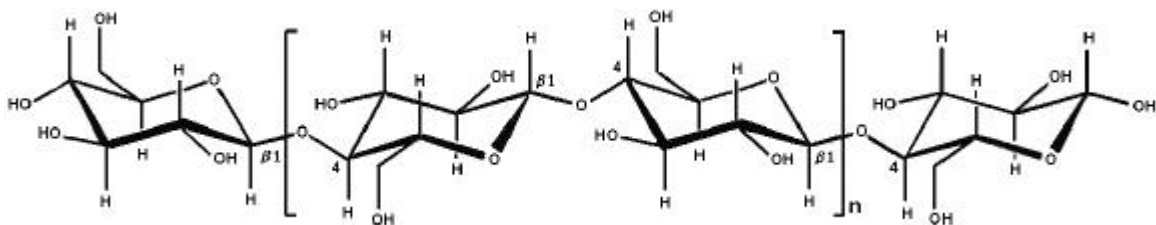


Figura 4. Estructura química de la celulosa

1.4.1 Mecanismos de la síntesis de celulosa

La vía metabólica para la síntesis de celulosa consiste de los siguientes pasos: la glucosa es transportada a través de la membrana bacteriana por la glucosa permeasa y fosforilada por la glucosa cinasa, para formar glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es isomerizada por la fosfoglucomutasa a glucosa-1-fosfato, la cual es transformada a glucosa uridina-5'-difosfato (UDP-Glucosa) por la UDPG pirofosforilasa. Finalmente, la UDP-Glucosa es polimerizada a celulosa por acción de la celulosa sintasa (CS) (15,16).

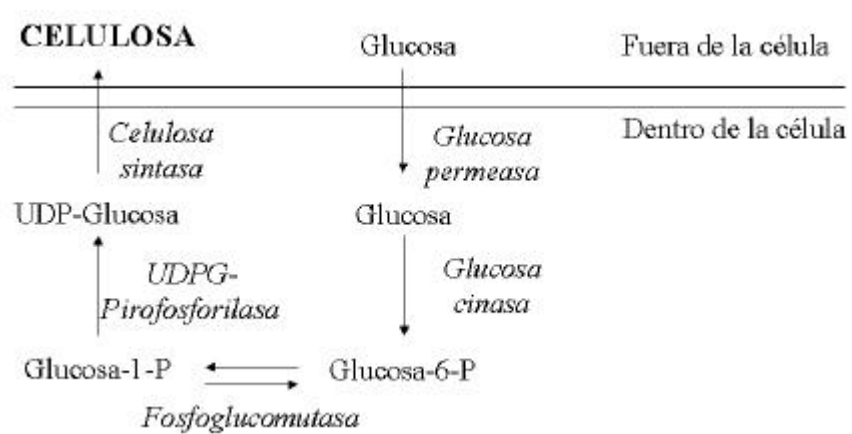


Figura 5. Reacciones involucradas en la síntesis de celulosa bacteriana. Modificado de (15,17).

1.4.2 Síntesis de celulosa en otras bacterias

La síntesis de celulosa en bacterias no está limitada para *G. xylinus*. Algunas bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Agrobacteria*, *Rhizobia* y *Enterobacteria* producen este biopolímero como parte de su matriz extracelular.

1.4.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*

A diferencia de *G. xylinus*, donde las fibrillas de celulosa son sintetizadas en forma de listones que emergen de un polo de la célula y se unen para formar una película de celulosa,

en *Agrobacterium tumefaciens*, las fibrillas de celulosa emergen al azar en diferentes sitios de la superficie celular. Estas fibrillas juegan un papel importante en la patogénesis y sirven para adherir a la bacteria a células huésped de plantas. En estas bacterias, la producción de celulosa es estimulada por la presencia de células o extractos de plantas (18). El c-di-GMP también actúa como un regulador alostérico de la CS en esta bacteria. Experimentos realizados en extractos celulares de *A. tumefaciens* mostraron que la incorporación de c-di-GMP estimula la síntesis de celulosa en extractos de la cepa de C58 de esta bacteria. Hay un modelo propuesto para la síntesis de celulosa en *A. tumefaciens* en el cual, la UDP-glucosa se une primero a un componente lipídico. El intermediario lípido-glucosa en el citoplasma sufre de modificaciones por el producto del gen *celB* para ser incorporado por la CS a las cadenas de celulosa (19).

1.4.2.2 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

En la bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, se identificaron genes involucrados en la síntesis de celulosa mediante una mutagénesis al azar por transposición, en una cepa sobreproductora de celulosa. Esta cepa se identificó por su habilidad de unir el colorante rojo congo, empleado en la identificación de bacterias productoras de celulosa y de “curli” (también conocido como fimbria agregativa o pili tipo I) (20). El análisis de micrografía de esta cepa mostró una abundancia de micro-fibrillas de celulosa, que emergen radialmente de todas partes de la superficie celular, diferenciándose muy claramente de los flagelos. El tratamiento con la enzima celulasa resultó en la total desaparición de las fibrillas. Una mutagénesis por transposición, permitió la identificación de dos posibles reguladores de la síntesis de celulosa, CelR1 y CelR2 (21). Los genes *celR1* y *celR2* están organizados en un operón y comparten homología con productos de genes involucrados en transducción de señales en sistemas de dos componentes. CelR1 comparte homología con la proteína histidina cinasa FixL de *Rhizobia*, que es un sensor de oxígeno que participa junto con el regulador transcripcional FixJ en la regulación transcripcional de genes de fijación de nitrógeno. Se ha demostrado que la proteína CelR2 tiene actividad de diguanilato ciclasa, es decir, cataliza la síntesis de c-di-GMP y además comparte homología con las proteínas DivK y PleD que son dos reguladores transcripcionales de *Caulobacter crescentus* y que

son fosforilados por una misma histidina cinasa PleC, proteínas esenciales en la regulación de la división celular de *C. crescentus* (21,22).

1.4.2.3 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*

En enterobacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*, también se ha detectado la producción de celulosa (23). La multicelularidad es un comportamiento común en bacterias patógenas y ambientales, en ciertas etapas del desarrollo, que les ofrece ciertas ventajas ecológicas. Las bacterias se benefician de la cooperación multicelular para acceder a recursos que no pueden ser utilizados efectivamente por células individuales (24).

El comportamiento multicelular (morfotipo *rdar*) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*, está caracterizado por la formación de colonias extendidas y de superficie seca, en placas de cultivos en fase estacionaria, que construyen una red celular y que se adhieren a superficies, mientras que en cultivos líquidos en fase estacionaria se observan agregados de células (25,26).

En el morfotipo *rdar*, las células de *S. typhimurium* en placas de cultivo con el colorante RC se observan como colonias rojas, debido a la absorción del colorante por la producción de celulosa y de “curli”, únicamente en fase estacionaria (25). El morfotipo *rdar* está regulado por el producto del gen *csgD*, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales FixJ (25). El gen *csgD* forma parte del operón *csgDEFG* y regula la transcripción del operón *csgAB* responsable de la biosíntesis de “curli” (26,27).

Por otro lado, la proteína CsgD regula transcripcionalmente al gen *adrA*, un gen que codifica para la proteína transmembranal AdrA, un posible regulador de la producción de celulosa en estas bacterias (16). Una mutante en el gen *csgA*, que codifica para la subunidad de “curli”, resulta en la formación de colonias color rosa (morfotipo *pdar*) que no produce fimbria y solamente produce celulosa. Una mutación en el gen *adrA* o en *rpoS* (factor sigma de la RNA polimerasa específico de fase estacionaria), da lugar únicamente a la

producción de fimbria y evita la producción de celulosa, resultando colonias de color café (morfortipo *bdar*) (26). El genoma de *E. coli* también tiene un operón *csgDEFG*, que regula la transcripción del operón divergente *csgAB*, que codifica para las subunidades estructurales de “curli” de manera similar a la regulación de *S. typhimurium* (28,29).

Un análisis de mutantes de *Salmonella enteritidis*, demostró que la celulosa es un componente requerido para la formación de biopelículas (biofilms), una forma de vida de los microorganismos basada en comunidades multicelulares complejas, adheridas a una superficie. Mutantes deficientes en la producción de celulosa no mostraron alteraciones en cuanto a la capacidad de infectar células huéspedes; sin embargo, fueron más sensibles al tratamiento con hipoclorito de sodio, por lo que se sugiere que la producción de celulosa y la formación de biofilms en *S. enteritidis* le confieren protección a las células contra condiciones adversas del medio ambiente (23). Los genes requeridos para la síntesis de celulosa, homólogos a los de *G. xylinus*, están presentes tanto en *S. typhimurium* como en *E. coli* (16,23).

1.5 Dominios GGDEF y EAL

Los dominios GGDEF y EAL se asociaron por primera vez a la síntesis y degradación, respectivamente, del segundo mensajero c-di-GMP en las proteínas diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDEA) de *G. xylinus*. Posteriormente el análisis de secuencias de genomas bacterianos a gran escala, mostró la abundancia de estos dominios, los cuales representan dos de las superfamilias mas grandes de proteínas en el reino *Bacteria*, pero que no están presentes en proteínas codificadas en los genomas del reino *Arquea* ni del reino *Eucaria*, dándole al c-di-GMP un reconocimiento como una molécula de señalización general únicamente para bacterias (30).

1.5.1 Descripción de los dominios GGDEF y EAL

El dominio GGDEF consta de aproximadamente 170 residuos de aminoácidos y recibe este nombre debido al patrón de secuencia conservado GG[DE][DE]F. En una búsqueda de

proteínas homólogas a las que tienen el dominio GGDEF se encontró que este dominio está relacionado estructuralmente con la familia de las adenilato ciclasas. La comparación por métodos bioinformáticos de estas proteínas muestra la conservación de dominios y de residuos catalíticos importantes así como de patrones de hidrofobicidad similares, lo cual sugiere que ambas familias, las adenilato ciclasas y las que tienen dominio GGDEF, se relacionan evolutivamente y que probablemente los mecanismos de catálisis son similares (30,31).

El dominio EAL que se denomina así por sus residuos conservados (glutamato-alanina-leucina) consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y se describió originalmente en la proteína BvgR de *Bordetella pertusis*, un factor transcripcional que regula los genes de virulencia (*vrg*) en esta bacteria (30,32). Por otro lado, el dominio EAL se descubrió independientemente como un dominio adyacente al dominio GGDEF y se propuso que era el posible responsable de la actividad de fosfodiesterasa de c-di-GMP en la proteína PdeA1 de *G. xylinus* (14). Este dominio contiene residuos de aminoácidos de carácter ácido que podrían participar en la unión a metales y potencialmente podrían formar un sitio activo de fosfodiesterasa (30).

1.5.2 Distribución de los dominios GGDEF y EAL

Las vías de señalización mediadas por c-di-GMP no son equitativamente abundantes en las especies bacterianas (Tabla I). Algunas bacterias tienen menos proteínas con el dominio GGDEF que otras, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* tiene solamente una proteína con el dominio GGDEF, *Bacillus subtilis* tiene 4 proteínas con este dominio, mientras que *Synechocystis sp* tiene 22 proteínas con dominio GGDEF, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tiene 33, *E. coli* K-12 tiene 19, *Vibrio cholerae* O1 biotipo ElTor tiene 41 y *Aquifex aeolicus* 12 proteínas con el dominio GGDEF (30). De manera similar, el dominio EAL también se encuentra en varias proteínas de un mismo genoma bacteriano, por ejemplo, *E. coli* K-12 tiene 17 proteínas con dominio EAL, mientras que *B. subtilis* tiene 3 y aún el pequeño genoma de *Rickettsia prowazekii* codifica para una proteína con dominio GGDEF y una con dominio EAL (30,33). Hasta el momento, el mayor número de proteínas que

contienen estos dominios se ha encontrado en el genoma de la bacteria *Vibrio vulnificus* que tienen 66 proteínas con dominio GGDEF y 33 con dominio EAL. Por otro lado, estos dominios están ausentes en las proteínas codificadas en los genomas secuenciados de Bacteroidetes, Clamidias y Fusobacterias (33).

Bacteria	GGDEF	EAL
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	8
<i>Bacillus halodurans</i>	4	2
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	0
<i>Caulobacter crescentus</i>	11	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	16	5
<i>Escherichia coli</i>	19	17
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0
<i>Mesorhizobium loti</i>	32	18
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	21
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	1
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	12	14
<i>Synechocystis sp</i>	23	13
<i>Thermotoga maritima</i>	11	0
<i>Vibrio cholerae</i>	41	22
<i>Vibrio vulnificus</i>	66	33
<i>Xylella fastidiosa</i>	3	3

Tabla 1. Número de copias de los dominios GGDEF y EAL presentes en algunas bacterias (30,33).

1.5.3 Dominios asociados a proteínas involucradas en la transducción de señales encontrados en proteínas con dominios GGDEF y EAL

Los análisis bioinformáticos muestran que algunas de las proteínas que contienen los dominios GGDEF y EAL existen como proteínas de un solo dominio, GGDEF o EAL, y en algunos casos ambos dominios se encuentran presentes en una sola proteína. Estos dominios se localizan en el extremo carboxilo de proteínas de organización modular, es decir, en proteínas que tienen otros dominios en el extremo amino y que por lo general son dominios de señalización celular; capaces de percibir una amplia variedad de señales como fosforilación, unión a proteínas, unión a moléculas gaseosas, entre otras. Otra fracción de proteínas con los dominios GGDEF y/o EAL está relacionada a proteínas con dominios periplásmicos o dominios integrados a la membrana (34,35). En algunos casos, los dominios periplásmicos pertenecen a familias bien caracterizadas de proteínas con dominios de unión a solutos, por ejemplo, dominios involucrados en la unión a aminoácidos, sugiriendo que la presencia de un aminoácido podría modular el recambio de c-di-GMP. En algunos casos, la arquitectura de las proteínas con dominios GGDEF y/o EAL es similar a la de proteínas histidina-cinasas o metil-acarreadoras de quimiotaxis, sugiriendo que el modo de acción de estas proteínas podría ser similar (33).

Una fracción importante de los dominios GGDEF y/o EAL está ligada a dominios sensores citoplásmicos como los dominios PAS y GAF, involucrados en la unión a pequeñas moléculas ligantes o en las interacciones proteína-proteína (33,36). Los dominios PAS se distribuyen ampliamente en las bacterias, las arqueas y los eucariotes. Están frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales. Estos dominios comparten un plegamiento típico de cadenas $\alpha\beta$ y están acoplados a actividades enzimáticas o a dominios de unión a DNA. Entre las señales que detectan los dominios PAS se encuentra el oxígeno, la luz, el voltaje, el potencial redox y los hidrocarburos aromáticos (37,38). Los dominios GAF tienen una estructura similar a los dominios PAS y se caracterizan por tener una estructura de bolsillo que pueden albergar pequeñas moléculas como ligantes (33). Los dominios GAF se describieron originalmente como dominios conservados de unión a GMPc en fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (30).

Por otro lado, en algunas bacterias, los dominios GGDEF y los EAL se asocian con los dominios CACHE (por la denominación en inglés calcium and chemotaxis) propios de los canales de Ca^{2+} y de los receptores de quimiotaxis, además, también se encuentran en homólogos a las tres principales clases de proteínas sensoras, las histidinas cinasas de clase I, las metil aceptoras (MCP's) y las adenilato ciclasas (35,38).

Los dominios GGDEF y EAL también se asocian al dominio CHASE (llamado así por la denominación en inglés cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular domain), módulo extracelular presente en varias proteínas sensoras, y aunque es menos común que el dominio CACHE, también se puede encontrar en histidinas cinasas, adenilato ciclasas y posibles diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas aunque no en sistemas de quimiotaxis (35,38).

El dominio MHYT (descrito en inglés como Met-His-containing YkoW transmembrane domain) es un dominio transmembranal que se encuentra en los sensores del tipo histidina cinasa presentes en los genomas de *B. subtilis*, de *C. crescentus*, de *M. loti* y de *P. aeruginosa*. Este dominio consiste de seis segmentos transmembranales interconectados por regiones citoplásmicas y regiones periplásmicas cortas ricas en arginina. En estas bacterias el dominio MHYT se encuentra en muchas proteínas como dominio único o bien fusionado a otros dominios de señalización tales como el PAS, el GGDEF, el EAL, el CheY y el dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice, HTH (por las siglas en inglés, helix-turn-helix). La función de este dominio no se conoce pero podría formar centros de cobre útiles en la detección del O_2 , del NO y del CO (39).

Los dominios NIT (por la designación en inglés nitrate- and nitrite-sensing), MASE1 y MASE2 (por la designación en inglés membrane-associated sensor) se descubrieron por medio del análisis de las secuencias de los genomas bacterianos. La función de estos se desconoce pero se propone que podrían participar en la detección del nitrato y del nitrito para el caso de NIT o bien para la detección de hierro y oxígeno en el caso de MASE1 y MASE2. Estos dominios se encuentran ligados a dominios de señalización y también a los

dominios GGDEF y EAL, al igual que el dominio HAMP característico de las proteínas histidina cinasas, adenilato ciclasas y MCP's (34,40).

Finalmente, el dominio HNOB (por la designación en inglés heme-nitric oxide binding) se asocia al dominio GGDEF y se encontró originalmente en las proteínas guanilato ciclasa solubles de eucariotes pero también en algunas proteínas de bacterias que participan como sensores en la quimiotaxis (41).

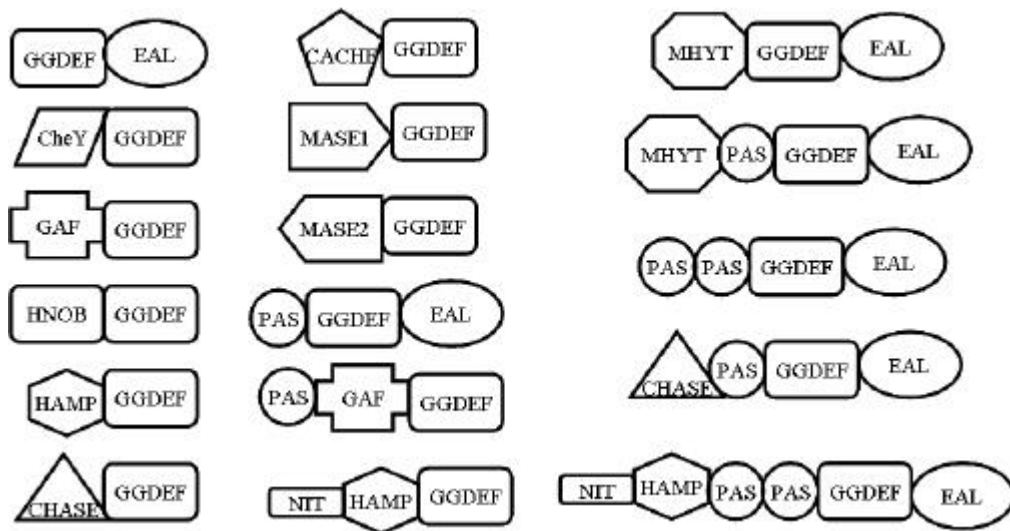


Figura 6. Asociación de los dominios GGDEF y EAL con otros dominios de señalización en bacterias.

Por lo anterior, la asociación de los dominios GGDEF y EAL con dominios de señalización celular sugiere que el c-di-GMP es una molécula mediadora de las respuestas a diversos estímulos ambientales o celulares (Fig. 7).

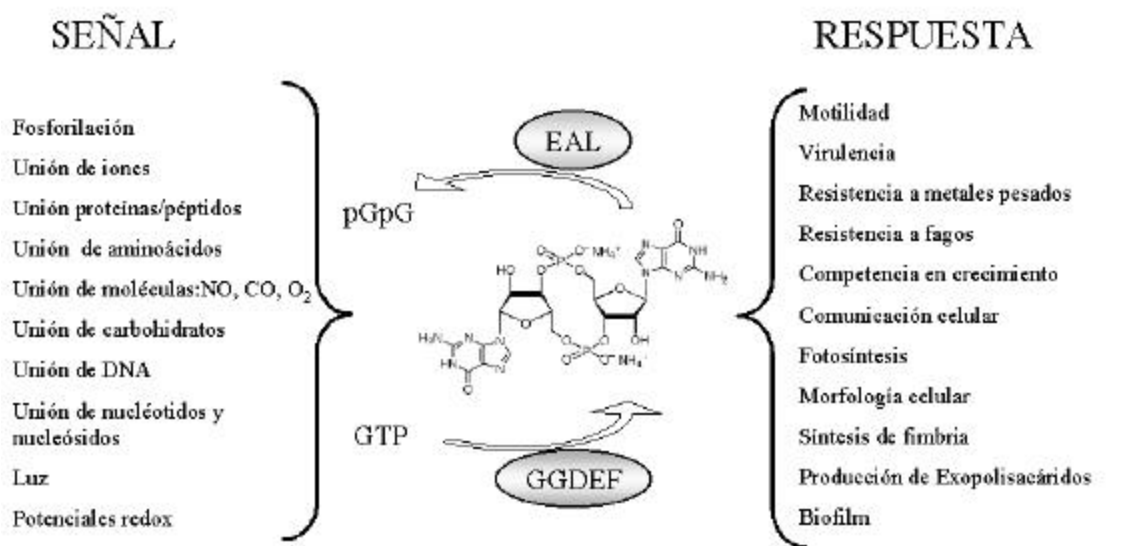


Figura 7. Procesos en los que el c-di-GMP potencialmente participa como segundo mensajero. Modificado de (42).

1.6 Papel de las proteínas con dominios GGDEF y EAL en el metabolismo de bacterias

1.6.1 *Gluconacetobacter xylinus*

La función de la mayoría de las proteínas que poseen los dominios GGDEF y EAL aún se desconoce; sin embargo, en la bacteria productora de celulosa *G. xylinus* se comprobó experimentalmente que las proteínas DGC y PDEA, que tienen estos dominios, son enzimas que sintetizan y degradan el c-di-GMP respectivamente (14).

Como se mencionó anteriormente, en *G. xylinus*, la concentración intracelular de c-di-GMP se determina por la acción opuesta de tres enzimas diguanilato ciclasa (Dgc1, Dgc2, Dgc3) y tres enzimas fosfodiesterasa de diguanilato (PdeA1, PdeA2, PdeA3), las cuales se codifican en tres operones independientes. Cada una de las tres proteínas DGC (codificadas por los genes *dgc1*, *dgc2*, *dgc3*) y las tres proteínas PDEA (codificadas por los genes *pdeA1*, *pdeA2* y *pdeA3*), muestran un arreglo de dominios PAS-GGDEF-EAL y un arreglo genético *dgc-pdeA* que sugiere una regulación tipo operón. El análisis comparativo de las

secuencias de aminoácidos de estas proteínas revela un alto grado de identidad estructural en cada grupo de isoenzimas. Las seis proteínas contienen los dominios GGDEF y EAL en las regiones de carboxilo terminal (C-terminal) y los dominios sensores en el amino terminal (N-terminal). Algunos estudios realizados en mutantes en los tres operones muestran que hay una jerarquía funcional en donde el operón *cdg1* es la fuente del 80% de la actividad enzimática de DGC y PDEA y los operones *cdg2* y *cdg3* contribuyen con el 15 y el 5 % de la actividad, respectivamente (11,14,43,44).

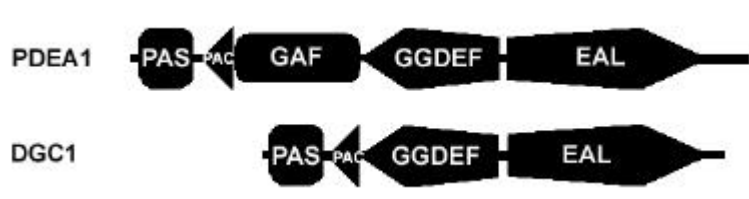


Figura 8. Organización modular de las proteínas Dgc1 y PdeA1 de *G. xylinus*. Modificado de (45).

Para probar la hipótesis de que los dominios GGDEF en diferentes proteínas tienen actividad de diguanilato ciclasa, se realizaron experimentos de complementación genética empleando tres genes distintos que codifican para proteínas cuyo único elemento en común es el dominio GGDEF. Los genes empleados fueron *celR2* (*R. leguminosarum* biovar trifolii), *dgc1* (*G. xylinus*) y *yddV* (también llamado *yhck*, *E. coli*) los cuales fueron clonados en vectores de expresión y utilizados para transformar una cepa mutante *celR2* (que codifica para una c-di-GMP sintasa) de *R. leguminosarum* bv. trifolii deficiente en la producción de celulosa. En los tres casos, la transformación resultó en la recuperación de la capacidad de producir celulosa. Estos datos genéticos sugirieron por primera vez que las proteínas que contienen el dominio GGDEF, poseen actividad de diguanilato ciclasa y que este dominio es el responsable de dicha actividad (22,46).

1.6.2 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus es la bacteria en la cual se ha estudiado con mayor detalle el papel del dominio GGDEF. En esta bacteria se ha descrito un mecanismo de diferenciación celular en el cual participa la proteína PleD que contiene un dominio GGDEF. Esta proteína codifica el gen *pleD* y se requiere para la diferenciación característica de células flageladas (móviles) a células no flageladas (no móviles) (47,48).

El desarrollo polar es una manifestación visual de la diferenciación celular en *C. crescentus*. Un polo de la célula pre-divisional tiene un único flagelo o pili tipo IV, mientras que el otro polo lleva una estructura llamada prosteca, de tal forma que la división celular produce dos células especializadas, una célula planctónica móvil y otra célula no móvil capaz de adherirse a superficies para formar monocapas de células (49). La proteína PleD participa negativamente en el control flagelar, la pérdida de la motilidad y la formación de la prosteca durante la transición de célula móvil a célula no móvil de *C. crescentus* y forma parte de un sistema de transducción de señales del tipo de dos componentes, en donde PleD es un regulador de respuesta, el cual es fosforilado por las histidinas cinasas PleC y DivJ (47).

PleD tiene en su extremo amino dos dominios receptores (D1 y D2) y en el C-terminal, a diferencia de los reguladores de respuesta típicos de los sistemas de dos componentes que tienen un dominio HTH de unión a DNA, PleD tiene un dominio GGDEF capaz de sintetizar c-di-GMP (47,50). Solamente uno de los dominios receptores (D1) es fosforilable y la actividad de diguanilato ciclasa de PleD es independiente del estado de fosforilación de la proteína, aunque en su forma activa (fosforilada) tiene mayor actividad de ciclasa (47). En contraste, la actividad de diguanilato ciclasa de la proteína Rrp1 de *Borrelia burgdorferi* requiere de la fosforilación de la proteína (46).

La estructura cristalina de la proteína completa PleD en presencia de su producto de reacción c-di-GMP ha sido reportada (Fig. 9, (51)). Como se había predicho, el análisis cristalográfico muestra un arreglo lineal de tres dominios estructurales (D1, D2 y DGC)

conectados por cadenas de aminoácidos que forman estructuras de asa simples. Los dominios D1 y D2 muestran la topología esperada para los dominios receptores de aspartato de los reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes. El arreglo de estos dos dominios tiene una estructura globular que favorece el contacto entre ambos dominios. El dominio GGDEF (referido en este reporte como DGC por su actividad de diguanilato ciclasa) consiste de cinco cadenas β -plegadas rodeadas de hélices. El motivo GG(D/E)EF, la firma característica de los dominios GGDEF, se encuentra localizado en una horquilla central β y forma parte del sitio activo de la proteína. La estructura cristalina de PleD mostró dos moléculas de c-di-GMP unidos en la interfase de los dominios D1/D2 y DGC (Fig. 9, (51)).

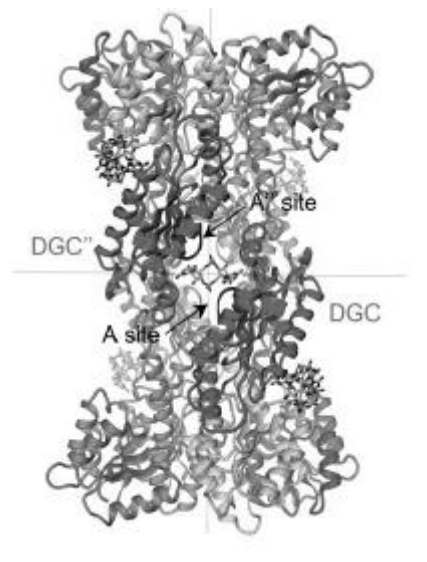


Figura 9. Estructura cristalina de la proteína PleD de *Caulobacter crescentus* (51).

Algunos datos cinéticos junto con los datos de la estructura cristalina permitieron elucidar un mecanismo de acción de la enzima PleD. Esta proteína requiere la dimerización para ser catalíticamente activa. PleD cataliza la condensación de dos sustratos idénticos (2 moléculas de GTP) los cuales se unen en el sitio activo de cada monómero. La unión del sustrato provoca la flexión de un péptido que funciona para enlazar al dominio DGC con los dominios D1/D2 (Figura 10) y esto permite la unión de los dos sitios activos del dímero de PleD (sitios A) para llevar a cabo la reacción de condensación ($2\text{GTP} \rightarrow \text{c-di-GMP} + 2\text{PPi}$). La actividad de PleD es inhibida alostéricamente por producto, es decir, el producto de la reacción, c-di-GMP puede dimerizarse a su vez y unirse a un sitio de la interfase

D1/D2-DGC (llamado “sitio I” de inhibición) para inmovilizar la parte flexible de la proteína e impedir el acercamiento de los sitios activos (51). Este mecanismo de acción de la proteína PleD sugiere que existe un control estricto de la concentración intracelular de c-di-GMP en *C. crescentus*, lo cual es importante si esta molécula actúa sobre otros sistemas dentro de la célula. El estudio de la proteína PleD de *C. crescentus* muestra que el c-di-GMP participa en procesos distintos a la síntesis de exopolisacáridos, como lo es la diferenciación celular (47).

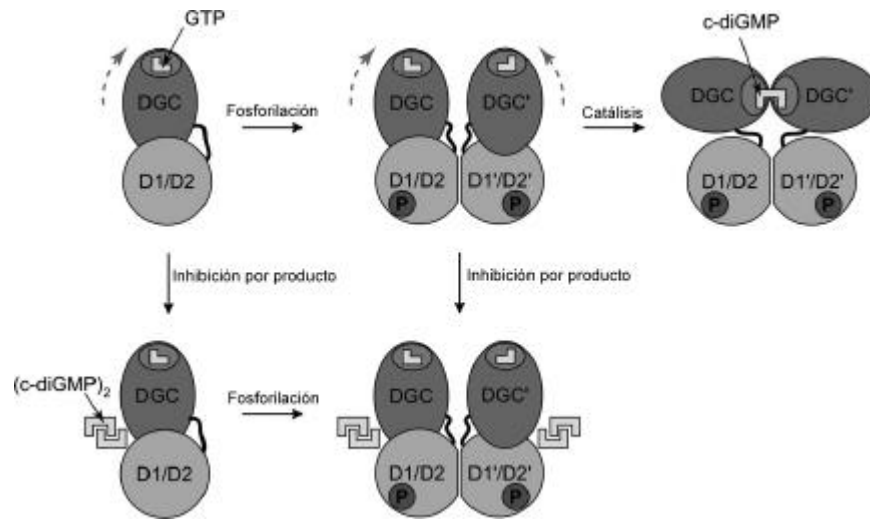


Figura 10. Mecanismo de acción propuesto para la enzima PleD de *C. crescentus*. Modificado de (51).

1.6.3 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

La agregación celular es un comportamiento común en las bacterias patógenas y en los aislados ambientales en ciertas etapas del desarrollo lo que les ofrece ventajas ecológicas. Las bacterias se benefician de la cooperación multicelular para acceder a los recursos que no pueden utilizar efectivamente como células individuales. En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium el comportamiento multicelular ocurre como consecuencia de cambios en la composición de la matriz extracelular. Estos cambios se producen al sintetizar “curli”, celulosa o ambos compuestos y dan lugar a tres morfotipos: el morfotipo *rdar* se aparece cuando *Salmonella* produce “curli” y celulosa, se caracteriza por colonias de apariencia

rugosa y de color rojo en placas de medio suplementado con el colorante rojo congo. El morfotipo *bdar* se produce cuando se sintetiza únicamente “curli” y da lugar a colonias lisas de color café y el morfotipo *pdar* que da origen a colonias lisas y de color rosa es característico de células que únicamente producen celulosa(52).

El genoma de *S. typhimurium* codifica para cinco proteínas con dominio GGDEF, siete proteínas con el dominio EAL y siete proteínas con ambos dominos. AdrA es una proteína de 371 aminoácidos con un extremo amino que contiene cuatro regiones transmembranales comprendidas en un dominio MASE2 anteriormente descrito y un dominio GGDEF de 180 aminoácidos en el extremo carboxilo (26). Algunos estudios mostraron que en células de *S. typhimurium* la sobreexpresión del dominio GGDEF de la proteína AdrA producen una elevada concentración celular de c-di-GMP mientras que la sobreexpresión del dominio EAL de la proteína YhjH de *E. coli* reduce la concentración de c-di-GMP. Estas fluctuaciones en la concentración intracelular de c-di-GMP regulan la síntesis de celulosa, la adherencia a superficies abióticas y la motilidad (52,53).

En *S. typhimurium* la celulosa es un componente importante para la formación de biopelículas (23,52). Un análisis de complementación de una cepa de *S. typhimurium* que no forma biopelículas con un banco genético de una cepa productora de biopelículas llevó a la identificación de un grupo de siete genes capaces de restaurar la formación de biopelículas. Todos ellos codifican proteínas que comparten el dominio GGDEF. Estas proteínas se nombraron Gcp (por la designación en inglés GGDEF domain containing protein). Por otro lado, una mutante Δ *adrA* se transformó sistemáticamente con cada uno de los genes *gcp* expresados en un plásmido y el resultado fue que no todas las proteínas Gcp restauraron la producción de celulosa en esta mutante. Dos proteínas, GcpA y MlrA fueron las que corrigieron en mayor grado la deficiencia en la síntesis de celulosa. Una de estas proteínas, GcpE, no pudo complementar a la mutante en *adrA* y su sobreproducción eliminó la producción de celulosa en una cepa silvestre; por el contrario, una mutación en el gen *gcpE* incrementó la producción de celulosa. La proteína GcpE además del dominio GGDEF contiene un dominio EAL por lo que se sugiere que esta proteína podría actuar como una fosfodiesterasa (54). Debido a que se encontraron varias proteínas con dominios

GGDEF capaces de restaurar el fenotipo de producción de celulosa y formación de biopelículas, este trabajo sugirió que existe un orden jerárquico en la utilización de proteínas GGDEF para la transducción de señales (54).

Recientemente, el grupo de Ute Romling demostró que el c-di-GMP es requerido para regular los dos componentes que producen el morfotipo rdar (celulosa y “curli”). En concentraciones elevadas de c-di-GMP además de la celulosa, también se eleva la síntesis de “curli”, superando la regulación del factor transcripcional CsgD requerido para la transcripción del operón *csgAB*, que codifica para las subunidades estructurales del “curli” (28,55). Un análisis por Northern blot del transcrito de *csgD* durante la sobreexpresión de Adra y YhjH reveló que el c-di-GMP es requerido para la activación de la expresión del gen *csgD* a nivel transcripcional. La mutación del gen *adrA* en el cromosoma no alteró la expresión del gen *csgD*, pero sí se modificó por otras mutaciones en los genes STM2123 y STM3388 que también codifican para proteínas con dominios GGDEF (55). En este mismo estudio, se cuantificó la cantidad de c-di-GMP producido por la sobreexpresión de estas tres proteínas (Adra, STM2123 y STM3388) y encontraron que sólo Adra contribuye significativamente a incrementar la concentración absoluta de c-di-GMP en la célula. Mientras que la sobreexpresión de Adra produce cantidades de c-di-GMP en el orden de picomoles, lo cual significa un aumento de aproximadamente 10,000 veces la concentración basal de c-di-GMP, las proteínas STM2123 y STM3388 únicamente incrementaron los niveles de c-di-GMP cinco y tres veces del nivel basal respectivamente (55). Estos resultados sugieren que la cantidad de c-di-GMP producida en la célula dependerá de la actividad y la concentración de las distintas proteínas con dominios GGDEF y/o EAL y probablemente la actividad de estas proteínas también depende de la estructura y la organización modular, es decir, de los dominios presentes en estas proteínas adicionales a los dominios GGDEF y/o EAL (Fig. 6) (55).

En una búsqueda de los genes implicados en la virulencia de *S. typhimurium* mediante mutagénesis por inserción de transposón se encontró al gen *cdgR* (por c-di-GMP regulator), que codifica para una proteína capaz de disminuir los niveles celulares de c-di-GMP y que tiene únicamente un dominio EAL17. La proteína CdgR confiere resistencia al estrés

oxidativo pues mutantes del gen *cdgR* son más susceptibles a la acción bactericida del H₂O₂ que la cepa silvestre o que una cepa complementada con el gen *cdgR* silvestre. Esta proteína CdgR también participa en la virulencia de *S. typhimurium* al incrementar su capacidad para sobrevivir en macrófagos (56).

1.6.4 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es una bacteria patógena que puede cambiar reversiblemente de un estado virulento a uno no virulento. En el fenotipo virulento la bacteria está embebida en una red de polisacáridos extracelulares que le confieren a la colonia una apariencia rugosa y que favorece la formación de biopelículas. En el fenotipo no virulento se abate la síntesis de exopolisacáridos por lo que las colonias muestran una apariencia lisa (57).

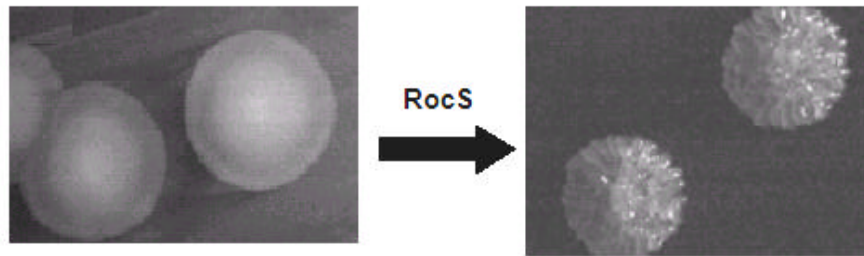


Figura 11. Morfología de células de *Vibrio cholerae* en estado no virulento y virulento. Tomado de (58).

En una búsqueda de los determinantes que intervienen en el cambio reversible de células rugosas a lisas y viceversa, se encontró a la proteína RocS que es una proteína que tiene los dominios GGDEF y EAL. Las mutantes afectadas en el gen *rocS* no son capaces de cambiar al fenotipo rugoso y presentan deficiencias en la motilidad por lo que se sugiere que RocS tiene un papel importante en la regulación de los determinantes de virulencia de esta bacteria. El análisis de la secuencia de la proteína RocS mostró que tiene mayor similitud con la enzima diguanilato ciclasa (Dgc1) que con la fosfodiesterasa (PdeA1) de *G. xylinus* ya que estas proteínas Dgc1 y PdeA1 tienen también los dominios GGDEF y EAL (14). Por otro lado, el hecho de que una mutante *rocS* no puede sintetizar exopolisacáridos es consistente con la incapacidad de sintetizar celulosa en una mutante *dgc1* en *G. xylinus*

(57) y con la disminución en la motilidad (53). La proteína RocS podría regular la producción de exopolisacáridos, la formación de las biopelículas y la virulencia a través del segundo mensajero c-di-GMP (57).

La virulencia de *V. cholerae* está regulada por otros factores además de la proteína RocS. Entre estos factores se encuentran el sistema de tres componentes VieSAB codificadas en el operón *vieSAB* en donde VieS es una histidina cinasa mientras que VieA y VieB son dos reguladores de respuesta que participan en la regulación transcripcional del operón *ctxAB* que codifica para las subunidades A y B de la toxina de cólera (CT). Probablemente es una regulación indirecta pues los niveles de mensajero de *toxT*, el gen de uno de los reguladores transcripcionales del operón *ctxAB*, disminuyen en una cepa Δ *vieSAB* (59) .

VieA es una proteína que porta un dominio EAL, pero que además tiene las características propias de los reguladores de respuesta típicos de los sistemas de dos componentes: un residuo de aspartato fosforilable y un dominio de unión a DNA (HTH) (30). Esta proteína también regula indirectamente la producción de los exopolisacáridos en *V. cholerae*. Los operones *vpsA-D* y *vpsL-Q* codifican para la síntesis de los exopolisacáridos cuya activación transcripcional depende del factor VpsR. Por su parte, la proteína VieA disminuye los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la actividad de fosfodiesterasa que le confiere el dominio EAL. Esta disminución provoca que los niveles de transcrito del gen *vpsR* bajen y por tanto disminuya también la transcripción de los genes *vps* y la síntesis de exopolisacáridos que se requieren para la formación de biopelículas (58). El cambio en concentración de c-di-GMP parece ser una consecuencia de la disminución en la actividad de fosfodiesterasa del dominio EAL de VieA o del aumento de la actividad de ciclasa de una o más proteínas GGDEF. Se propone que los genes *vps* responden al incremento en la concentración de c-di-GMP a través de algún factor de transcripción que percibe este compuesto y regula la expresión del gen *vpsR* (58).

La proteína MbaA (por la designación en inglés maintenance of biofilm architecture) es otra de las múltiples proteínas que presentan los dominios GGDEF y EAL en *V. cholerae*. Esta proteína participa en la maduración y el mantenimiento de la arquitectura de la

biopelícula en esta bacteria. La mutación $\Delta mbaA$ no afecta las etapas tempranas de la formación de la biopelícula pero provoca una acumulación del material extracelular que resulta en una formación de una biopelícula de arquitectura distinta a la típica de pilares de células separados por canales. Aunque no se ha demostrado, los dominios presentes en la proteína MbaA sugieren que esta proteína podría regular las concentraciones del segundo mensajero c-di-GMP, posiblemente requerido para el mantenimiento de la matriz extracelular en las biopelículas de *V. cholerae* (60).

1.6.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que habita en una amplia variedad de ambientes entre los que se incluye el suelo, el agua, los tejidos de plantas y los tejidos de mamíferos, entre otros. En los humanos, *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista y afecta a individuos inmunocomprometidos o que sufren de fibrosis quística (61).

Del esputo de pacientes con fibrosis quística se pueden aislar variantes de *P. aeruginosa* que presentan resistencia al tratamiento con antibióticos y que comparadas con células no resistentes presentan una morfología distinta. Las células resistentes a los antibióticos forman colonias pequeñas y de apariencia rugosa (RSCV por la designación en inglés rough small-colony variant). En contraste, las células sensibles forman colonias lisas de mayor tamaño. Las células RSCV forman agregados de células en medio de cultivo líquido, y biopelículas con mayor contenido de biomasa y de arquitectura distinta a las que pueden formar las células sensibles.

P. aeruginosa es capaz de cambiar del fenotipo RSCV al fenotipo silvestre de manera transitoria, lo que le permite a la bacteria modificar su resistencia a antibióticos. Estos cambios están regulados por la proteína PvrR, un regulador de respuesta del tipo de los sistemas de dos componentes, homólogo a la proteína VieA de *V. cholerae* en todos sus dominios incluyendo el dominio EAL (62). La presencia del dominio EAL sugiere que la disminución de los niveles de c-di-GMP podría ser un factor determinante en estos

procesos y potencialmente un arma importante para el tratamiento de infecciones por esta bacteria (7,63).

Por otro lado, la autoagregación de *P. aeruginosa* provoca la formación de colonias rugosas y está relacionada con la adhesión de las células en el proceso de formación de biopelículas. Esta agregación la regula la proteína WspR, un factor transcripcional del tipo regulador de respuesta de sistemas de dos componentes que tiene un dominio GGDEF (64). La función opuesta sugerida para los dominios GGDEF y EAL es consistente con la actividad mostrada por la proteína WspR (GGDEF) para inducir la autoagregación y la actividad de la proteína PvrR (EAL) para evitarla (7).

P. aeruginosa tiene 33 proteínas con el dominio GGDEF y 21 proteínas con el dominio EAL (30); sin embargo, se conoce la función de algunas de estas proteínas. Por ejemplo, la proteína FimX tiene ambos dominios y se localiza en un polo de la célula. A esta proteína se le ha relacionado con la regulación del movimiento tipo “twitching”, que es un movimiento provocado por la extensión y retracción del pili requerido para la formación de biopelículas (65).

1.6.6 *Yersinia pestis*

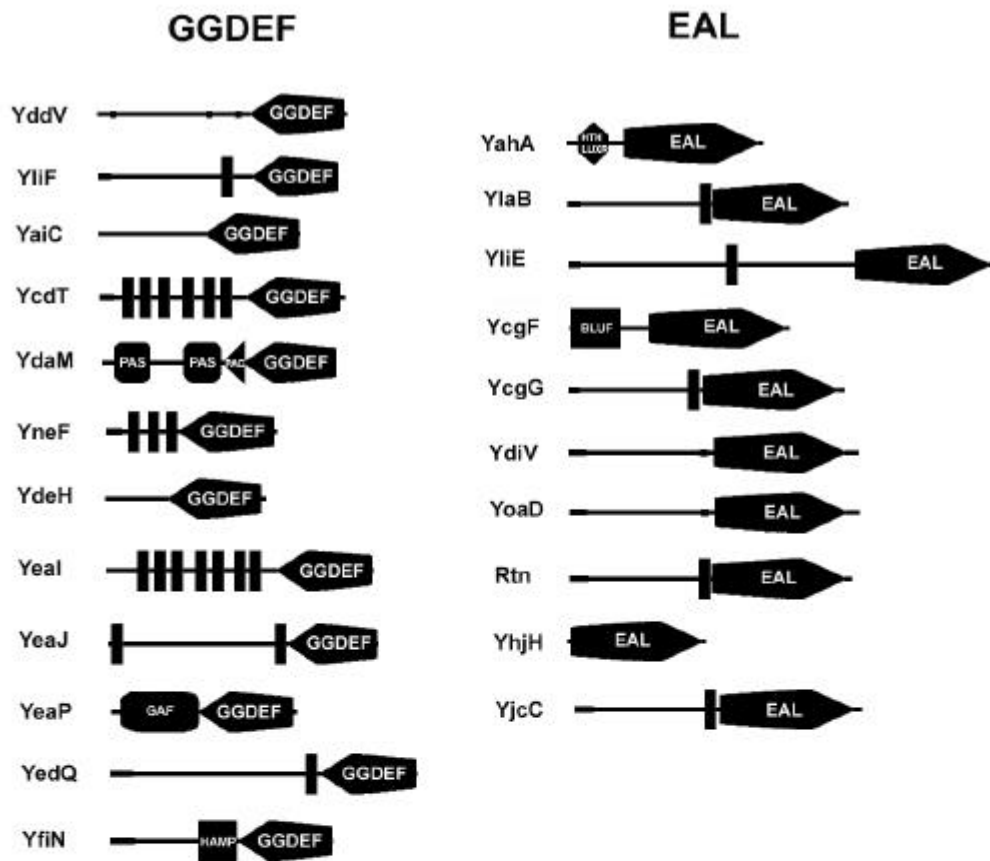
Con la publicación constante de genomas bacterianos secuenciados en su totalidad se han identificado cada vez más proteínas con dominios GGDEF y EAL. De la mayoría de ellas se desconoce su función pero se les ha ido involucrando en diferentes procesos bacterianos. Por ejemplo, el caso de las proteínas HmsT y HmsP de *Yersinia pestis*. Esta bacteria tiene la capacidad de formar colonias teñidas de color café verdoso o rojo al unir hemina o rojo congo (RC) respectivamente (fenotipo Hms+), a temperaturas menores a 34°C. A mayor temperatura las colonias son siempre de color blanco (66).

Dentro de los genes involucrados en la regulación del fenotipo Hms+ se encuentran las proteínas HmsP y HmsT. La primera de estas proteínas, HmsP codifica para una fosfodiesterasa de c-di-GMP pues contiene un dominio EAL que le confiere dicha actividad

(67). Mutantes en *hmsP* forman colonias rojas en medio suplementado con RC a 26°C y a 37°C y la complementación en *trans* con el gen *hmsP* provoca la formación de colonias blancas a ambas temperaturas. Por otro lado, la proteína HmsT codifica para una diguanilato ciclasa, puesto que tiene un dominio GGDEF en su estructura capaz de sintetizar c-di-GMP (68). La formación de biopelícula en *Y. pestis* depende de los genes *hms*. Esta bacteria forma biopelícula a 26°C pero no a 37°C. Cuando se sobreexpresa el gen *hmsT* o hay una mutación en el gen *hmsP*, la formación de biopelícula se incrementa considerablemente por lo que se sugiere que su formación depende de la concentración de c-di-GMP (67).

1.6.6 *Escherichia coli*

Como se mencionó anteriormente, *E. coli* tiene 12 proteínas con el dominio GGDEF, 10 proteínas con dominio EAL y 7 proteínas con ambos dominios (Figura 12). La función de estas proteínas en el metabolismo de *E. coli* es aún desconocida pero reportes recientes las han involucrado con el recambio de c-di-GMP en la célula (54,69-72).



GGDEF y EAL

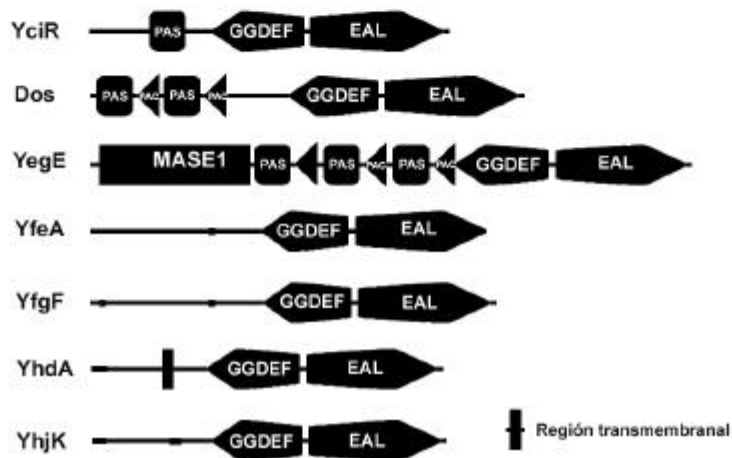


Figura 12. Proteínas de *E. coli* que tienen los dominios GGDEF y/o EAL (Fuente Swiss-Prot Database, <http://ca.expasy.org>).

Una de estas proteínas con dominios GGDEF y EAL de *E. coli* que se ha estudiado estructuralmente a detalle es la proteína Dos. Esta proteína tiene un extremo amino con dos dominios PAS, uno de ellos asociado a un grupo hemo y un extremo carboxilo con un dominio de fosfodiesterasa (Fig. 11). La proteína Dos fue descrita originalmente como un sensor directo de oxígeno (direct oxygen sensor) por la unión reversible de O₂ al grupo hemo con mayor especificidad que con otros ligantes como NO o CO (73).

Se ha reportado que Dos exhibe actividad de fosfodiesterasa de AMP cíclico y la forma ferrosa del grupo hemo confiere la forma activa de la proteína, mientras que en estado oxidado es inactiva (74). En contraste, en otras condiciones experimentales, la proteína pura muestra actividad de fosfodiesterasa frente a c-di-GMP pero no frente a cAMP (69) lo que ha generado controversias en cuanto a la verdadera actividad de esta proteína (37). La estructura cristalina de la proteína Dos muestra la formación de un dímero (75,76); sin embargo, la proteína Dos también forma homotetrámeros y la región C-terminal es responsable de ésta oligomerización (77).

Las características físicas de unión del grupo hemo han sido estudiadas a detalle (73,78-80). El residuo Asp40 juega un papel principal en mantener la estructura electrónica del hierro. Mutaciones en este residuo eliminan la actividad catalítica hacia cAMP (81). Los residuos His77 (74,80) y Met95 coordinan al grupo hemo (80). La coordinación por el residuo Met95 parece ser indirecta, probablemente mediada por una molécula de agua (82). Cuando una molécula de O₂ o CO se une al hierro, la interacción hemo-Met95 se rompe, provocando un cambio conformacional en la proteína (80). La presencia de iones Mg²⁺ es requerida para la actividad enzimática y al parecer este metal es unido por los residuos His590 y His594 (77).

A pesar de la abundante información estructural que existe acerca de la proteína Dos, su papel fisiológico en el metabolismo de *E. coli* es aún incierto. El gen *dos* (también llamado *b1489* o *yddU*) que codifica para esta proteína está localizado a 24 pb río abajo del gen *yddV* (también llamado *b1490*). La función de la proteína YddV también es desconocida pero se ha demostrado que tiene actividad de diguanilato ciclasa (22,53,72).

1.7 Objetivo de esta tesis

La amplia distribución de las proteínas con dominios GGDEF y EAL en el reino *bacteria* abren una nueva ventana de investigación para la elucidación del papel fisiológico y las vías de señalización del segundo mensajero c-di-GMP , lo que constituye uno de los tópicos mas interesantes en la microbiología actual de bacterias.

La presente tesis tiene como objetivo principal, aportar información que pueda ayudar al entendimiento del papel de este nuevo segundo mensajero c-di-GMP, a través del análisis genético y fisiológico del operón *yddV-dos* de *Escherichia coli*.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas empleadas en este estudio

Cepas de <i>E. coli</i>	Genotipo relevante	Fuente o referencia
BW25113	[Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-4</i>), <i>lacI</i> p-4000(<i>lacI</i> ^Q), λ^- , <i>rpoS</i> 396(<i>Am</i>), <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>rrnB-4</i> , <i>hsdR</i> 514	B. Wanner
ECL5001	MC4100 Φ (<i>cydA</i> -' <i>lacZ</i>)	O. Kwon (83)
ECL5002	MC4100 Φ (<i>lldP</i> -' <i>lacZ</i>)	O. Kwon (83)
JC7623	F ⁻ <i>recB21 recC22 sbcB15 sbC201 argE3 thi-1 thr-1 leu-6 proA2 his-4 ara14 strA rpoS396(Am) lacY1 xylA5</i>	(84)
JMH0443	MC4100 transformada con el plásmido pKD46	Este trabajo
JMH0476	JC7623 pero Δ <i>dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH0478	MC4100 pero Δ <i>dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH0761	W3110 pero Δ <i>dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH0762	ECL5001 pero Δ <i>dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH0763	ECL5002 pero Δ <i>dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH0915	TE2680 pero Φ (<i>dos</i> -' <i>lacZ</i>)	Este trabajo
JMH0917	TE2680 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C	Este trabajo
JMH0919	TE2680 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L	Este trabajo
JMH0922	MC4100 pero Φ (<i>dos</i> -' <i>lacZ</i>)	Este trabajo
JMH0923	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C	Este trabajo
JMH1005	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C <i>rpoS</i> :: <i>tet</i>	Este trabajo
JMH1005	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L <i>rpoS</i> :: <i>tet</i>	Este trabajo
JMH1007	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L	Este trabajo
JMH1122	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C <i>fnr</i> :: <i>Cm</i>	Este trabajo
JMH1124	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C <i>arcA</i> :: <i>tet</i>	Este trabajo

JMH1133	MC4100 pero Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L <i>fnr</i> :: <i>Cm</i>	Este trabajo
JMH1232	MC4100 pero <i>ybeW</i> ::GBKan	JM. Ghigo (85)
JMH1479	MC4100 transformada con el plásmido pSE420	Este trabajo
JMH1480	W3110 transformada con el plásmido pSE420	Este trabajo
JMH1481	MG1655 transformada con el plásmido pSE420	Este trabajo
JMH1482	TOB1 transformada con el plásmido pSE420	Este trabajo
JMH1483	MC4100 transformada con el plásmido pYddV	Este trabajo
JMH1484	W3110 transformada con el plásmido pYddV	Este trabajo
JMH1485	MG1655 transformada con el plásmido pYddV	Este trabajo
JMH1486	TOB1 transformada con el plásmido pYddV	Este trabajo
JMH1493	MG1655 pero Δ <i>yddV-dos</i> ::kan	Este trabajo
JMH1740	BW2513 pero Δ <i>yddV-dos</i> ::kan	Este trabajo
MC4100	<i>F</i> (<i>araD139</i> Δ <i>argF-lac</i>) <i>U169 rpsL150 flbB5301</i> <i>deoC ptsF25 rbsR relA1</i>	(86)
MG1655	Silvestre (wt) <i>E. coli K-12</i>	F. Blattner
SH8150	W3110 pero Δ <i>cpdA</i> ::kan	H. Niki (87)
TE2680	<i>F</i> λ IN(<i>rrnD-rrnE</i>) <i>lacX74 rpsL galK2</i> <i>recD</i> ::Tn10d-Tet <i>trpDC700</i> :: <i>putPA13033</i> (Kan ^s Cm ^r <i>lac</i>)	(88)
TOB1	Aislado fecal	U. Romling (52)
W3110	<i>F lam</i> -In(<i>rrnD-rrnE</i>) <i>1 rph-1</i>	(89)
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (<i>F</i> ' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15 Tn10)	Stratagene
Fagos		
P1 _{vir}	Fago de transducción general	(90)

Tabla 2. Cepas empleadas.

2.2 Plásmidos empleados en este estudio

Plásmido	Genotipo	Fuente o Referencia
pKD46	[oriR101], [<i>repA101(ts)</i>], <i>araBp-gam-bet-exo</i> , (T^S)	B. Wanner
pKOBEG	<i>araBp-gam-bet-exo</i> , (T^S , Cm ^r)	J.M. Ghigo
pKOBEGA	<i>araBp-gam-bet-exo</i> , (T^S , Amp ^r)	J.M. Ghigo
pMM4	pUC18 pero con la construcción de 3.4 Kb $\Delta dos::kan$ la cual tiene 1.1 kb de cada región que flanquea al gen <i>dos</i> , clonadas en los sitios <i>EcoRI-PstI</i>	Este trabajo
pMM5	pTZ19R pero con la construcción de 3.4 kb $\Delta dos::kan$ la cual tiene 1.1 kb de cada región que flanquea al gen <i>dos</i> , clonadas en los sitios <i>EcoRI-PstI</i>	Este trabajo
pSE420	Vector de clonación para sobre-expresión Ap ^R <i>lacI^qP_{trc}</i> ColE1, <i>lacO</i> , g10 rBS.	Invitrogen
pTZ19R	Vector de clonación. F1 ori, pBR322 ori, <i>lacZ'</i> .	Pharmacia
pUC18	Vector de clonación. <i>ori colE1</i> , <i>lacI</i> , <i>lacZα</i>	Pharmacia
pUC4K-KIXX	Vector que contiene 1.3 kb del inserto <i>kan</i> flanqueado por sitios <i>BamHI</i>	Pharmacia
pYddV	pSE420 pero con el gen <i>yddV</i> clonado en los sitios <i>NcoI-SacI</i>	Este trabajo
PRS551	Vector de clonación <i>bla</i> , <i>kan</i> , T14, <i>lacZYA</i>	(88)
p Φ (<i>dos</i> -' <i>lacZ</i>)	PRS551 con la fusión Φ (<i>dos</i> -' <i>lacZ</i>)	Este trabajo
p Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C	PRS551 con la fusión Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _C	Este trabajo
p Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L	PRS551 con la fusión Φ (<i>yddV</i> -' <i>lacZ</i>) _L	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

2.3 Oligonucleótidos empleados en este estudio

Todos los oligonucleótidos fueron empleados a una concentración final de 40pmol/μl.

Para la mutagénesis del gen *dos*:

Dos EcoRI-L	GAT CGG GAA TTC TAC CAA TCA CCA GCA TAT C
Dos BamHI-L	ACG CAG GAT CCA CTG TCG CGT TAT TCA GG
Dos BamHI-R	GAT TAG GAT CCC ATC CTG GCG CAT CTA AAG AC
Dos PstI-R	GTT CGG ACT GCA GCG CCG CAG AAA AAC TTC AG
Left PstI 3'	ACG CAC CTG CAG CTG TCG CGT TAT TCA GG
Right PstI 5'	ATT ACT GCA GCA TCC TGG CGC ATC TAA AGA C

Para las fusiones *lacZ* y para 5'-RACE:

<i>dos-lacZ</i> Eco5'	GCT GAG AAT TCT CCT CTA TCC GGT GAT CTT CTC TTC GG
<i>dos-lacZ</i> Bam3'	CGT TAG GAT CCA CCG CAC CCA TCA TAT TTT GC
<i>yddV-lacZ</i> Eco5'	CCG AGA ATT CGA TCC GCT CGG TTC CGA TAC CCG
<i>yddV-lacZ</i> Bam3'	GAG CGG ATC CAA CGG CAA TTT CCG CGG C
<i>yddV-lacZ</i> larga Eco5'	CTG GGA ATT CAG GGG TGA AAC TGG TCG TGG C
<i>lacZ</i>	GGG GGA TGT GCT GCA AGG CG
<i>lacZ</i> rev	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC G

Para la mutagénesis del operón *yddV-dos*

Ampli Kan L5	GGG GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA A
Ampli Kan L3	GGG GGC GCT GAG GTC TGC CTC GTG A
YddV-GB-L3	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCATAATTCACACCCTTATAAGGCTGGG
YddV-GB-L3B	CCG GAA CTG AAA AAG CAG CTC GAT CTT AAC G
Dos-GB-L5	GCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACCTCAGCGCCTGACAAATTCCTCTCGCCCGCACTCGCGGGTTTTTC
Dos-GB-L5B	TTG CCA CAA CAT CGC CTG TGC TTG TTG TGG GCG

Para la clonación de *yddV* en pSE420

yddV-*NcoI*-5' CCC AGC CTT ATA AGG GCC ATG GTT ATG GAG ATG TAT
yddV-*SacI*-3' CTC TGA GCT CTG GCG CAT CTA AAG ACT GGC

Para RT-PCR

MM1 (*dos*-fwd) CGG GCT GCA TAC CGC TGG CTT CGC
MM2 (*dos*-rev) GAG GGG ATG AGT CGG GAG CTG C
MM3 (*yddV*-fwd) CGG TTG TGA CGA ATG TAT TCA GG
MM4 (*yddV*-rev) CCG CCG TTT CCT ACC GAC TAT CT

2.4 Medios de cultivo empleados en este estudio

Los medios líquidos se prepararon por disolución de los solutos indicados en agua destilada y la posterior esterilización a 15 psi y 121°C por 20 min. Cuando el medio estaba suplementado con MOPS, el tiempo de esterilización disminuyó a 15 min. Los medios sólidos se prepararon por adición de agar al 2% (w/v) a los medios líquidos y posterior esterilización bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Se utilizó medio Luria-Bertani (LB) para cultivos en medio líquido. Para los ensayos de formación de biofilm se usó medio LB suplementado con 100mM MOPS. Antes de esterilizar, el pH de los medios se ajustó a 7.0 con NaOH 2.5N o HCl concentrado según el caso.

Reactivo	Concentración final
NaCl	1 %
Triptona	1 %
Extracto de levadura	0.5 %

Tabla 4. Fórmula para la preparación de medio LB.

En algunos casos se utilizó medio mínimo para el crecimiento de cultivos líquidos de acuerdo a lo siguiente:

Reactivo	Concentración final
NH ₄ Cl	1 %
KH ₂ PO ₄	3 %
Na ₂ HPO ₄	6 %
NaCl	0.5 %
MgSO ₄	0.025%
Azúcares	0.2%
Tiamina	0.0005 %
Timina	20µg/ml
Aminoácidos	20mg/ml

Tabla 5. Fórmula para la preparación de medio mínimo (medio M9).

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm y adicionados al medio bajo condiciones de esterilidad a una temperatura del medio de cultivo menor a 50 °C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200 µg/ml (medio L2), cloramfenicol 25 µg/ml (medio L3), kanamicina 100 µg/ml (medio LBKan) y tetraciclina 25 µg/ml (medio L9). Cuando fue necesario se adicionó IPTG a una concentración final de 0.3, 0.5 o 1 mM y X-gal a una concentración final de 40 µg/ml. Para el crecimiento de cultivos en anaerobiosis, los medios fueron suplementados con Glucosa al 0.2%, o bien con nitrato de sodio (NaNO₃) a una concentración final de 40mM.

Para los ensayos con rojo congo (ácido benzidindiazo-bis-1-naftilamina-4-sulfónico C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂), al medio LB se le eliminó el NaCl y fue suplementado con:

Rojo Congo	20 µg/ml
Azul de Coomassie	10 µg/ml

Tabla 6. Suplementos para ensayos con rojo congo.

Para los ensayos con calcoflúor (Fluorescent Brightener 28 Sigma®, C₄₀H₄₄N₁₂O₁₀S₂), al medio LB se le eliminó el NaCl y fue suplementado con calcoflúor a una concentración final de 200 µg/ml.

2.5 Condiciones de cultivo

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 225 rpm.

Las incubaciones anaeróbicas se llevaron a cabo en tubos de ensayo con tapa de rosca llenados al máximo de su volumen e incubados en jarras de anaerobiosis, usando sistemas anaeróbicos GasPak™ (BBL Microbiology Systems) que generan una atmósfera compuesta por hidrógeno y dióxido de carbono. La condición anaeróbica fue comprobada mediante el uso de tiras de anaerobiosis (BBL®).

El crecimiento celular bacteriano fue monitoreado midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech) y celdas de plástico desechables de 1cm de paso de luz.

2.6 Técnicas básicas de Biología Molecular

2.6.1 Obtención de DNA cromosomal

La purificación de DNA cromosomal para la amplificación de fragmentos de DNA por PCR y digestión de DNA con enzimas de restricción se llevó a cabo por dos técnicas, la primera por extracción de DNA cromosomal por purificación por extracciones con fenol-cloroformo o empleando un kit comercial.

2.6.1.1 Extracción fenol-cloroformo

La purificación del DNA cromosomal por el método de extracción orgánica con una mezcla de fenol-cloroformo se llevó a cabo como se describe a continuación:

1. - Crecer un cultivo de 50 ml de la cepa seleccionada hasta DO a 600 nm entre 0.8 y 1.0.
2. - Cosechar las células por centrifugación a 3000rpm/10min/4°C.
3. - Resuspender en 10 ml de solución TE (Tris-HCL 25mM, pH8.0, EDTA 1 mM).
4. - Adicionar 10 mg de lisozima en polvo e incubar 15 min a 30 °C.
5. - Adicionar 1ml de SDS al 20%, agitar con pipeta 15 segundos para lisar las células. La solución se vuelve viscosa.
6. - Adicionar 10 ml de fenol (saturado con TE) y 1.5 ml de NaCl 5M. Invertir el tubo rápidamente a temperatura ambiente por 20 min.
7. - Separar las fases por centrifugación a 3000rpm durante 10 min.
8. - Remover la fase superior con una pipeta despuntada y transferirla a un tubo limpio.
9. - Adicionar un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) y mezclar invirtiendo por 10 min.
10. - Repetir los pasos 7 y 8.
11. - Adicionar un volumen de cloroformo y mezclar invirtiendo durante 10 min.
12. - Repetir los pasos 7 y 8.
13. - Adicionar un volumen de isopropanol suavemente por la pared del tubo (se forman dos fases por diferencia de densidad de los disolventes).
14. - Con una varilla de vidrio mezclar suavemente en la zona de interfase para recoger el DNA en forma de fibras enrolladas en la varilla.
15. - Lavar el DNA en etanol frío al 70%.
16. - Secar el DNA a temperatura ambiente.
17. - Resuspender el DNA en 1ml de TE. Se debe disolver totalmente.
18. - Adicionar RNAsa a 20 µg/ml de concentración final e incubar a 50 °C durante 1hora.
19. - Adicionar proteinasa K disuelta a una concentración final de 100 µg/ml. Incubar a 37 °C por 1h.
- 20.- Adicionar TE para ajustar el volumen a 5 ml.
- 21.- Adicionar un volumen de fenol:cloroformo (1:1). Mezclar invirtiendo por 10 min.
- 22.- Centrifugar y recuperar la fase superior.
- 23.- Adicionar un volumen de cloroformo. Mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
- 24.- Centrifugar y recuperar la fase superior.

25.- Repetir los pasos 13,14,15,16 y 17. El DNA puro se puede resuspender en buffer TE o en agua bidestilada.

2.6.1.2 “Wizard® Genomic DNA Purification kit” de Promega

En algunas ocasiones purificamos el DNA cromosomal con el kit comercial de Promega “Wizard® Genomic DNA Purification de acuerdo al siguiente protocolo sugerido por el fabricante.

- 1.- En un tubo Eppendorf, centrifugar 2 ml de un cultivo saturado de la cepa seleccionada a 14000 rpm en una microcentrífuga.
- 2.- Remover el sobrenadante y adicionar 600µl del reactivo “Nuclei Lysis Solution”. Se mezcla con la pipeta suavemente hasta que las células queden resuspendidas. Esta solución contiene, entre sus componentes principales, SDS para lisar las células.
3. Se incuba el tubo a 80°C durante 5 minutos para lisar las células y entonces se enfría a temperatura ambiente.
- 4.- Agregar 3µl de “RNase Solution” una solución que contiene una mezcla de Rnasas para eliminar el RNA presente en la muestra. Se invierte el tubo 2-3 veces para mezclar.
- 5.- Incubar a 37°C durante 20 minutos y dejar enfriar el tubo a temperatura ambiente.
- 6.- Agregar 200µl of “Protein Precipitation Solution”, una solución ácida para la precipitación de proteínas totales. Se mezcla en el vortex vigorosamente a mayor velocidad durante 20 minutos para asegurar la precipitación homogénea.
- 7.- Incubar la muestra en hielo durante 5 minutos para favorecer la precipitación.
- 8.- Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos.
- 9.- El sobrenadante se mezcla con un volumen de isopropanol, para precipitar el DNA. Para mejores resultados, se puede incubar 20 minutos a -20°C.
- 10.- El DNA precipitado se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos.
- 11.- Eliminar el resto del disolvente por evaporación.
- 12.- Disolver el DNA puro en 100 µl de H₂O bidestilada.

2.6.2 Obtención de DNA plasmídico

Para la purificación de plásmidos, empleamos la cromatografía de intercambio iónico que es el método más utilizado para la separación de ácidos nucleicos. El mecanismo básico es el intercambio reversible de los iones en solución con los grupos funcionales unidos covalentemente a una fase estacionaria insoluble llamada resina.

2.6.2.1 Kit “miniprep” QIAgen

La extracción de DNA plasmídico se realizó usando el kit de purificación de DNA de QIAGEN™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el protocolo “QIAprep Spin Miniprep Kit”, que permite la purificación de más de 20 µg de DNA plasmídico. La purificación de DNA plasmídico utilizando columnas de QIAgen de membranas de sílica gel se basa en un simple procedimiento de unión-lavado-elución. Los ácidos nucleicos son adsorbidos a la membrana de sílica gel en presencia de sales, las cuales remueven el agua de las moléculas de ácidos nucleicos hidratadas en solución. Los polisacáridos y las proteínas no se adsorben y son removidos.

El protocolo inicia con la lisis de las células bajo condiciones alcalinas (NaOH, SDS). El SDS solubiliza los componentes fosfolipídicos y proteicos de la membrana celular, permitiendo la lisis y liberación del contenido celular. El NaOH desnatura tanto el DNA cromosomal y de plásmido, así como las proteínas. El tiempo óptimo de lisis permite la máxima liberación del DNA de plásmido de la célula sin permitir la salida del DNA cromosomal, minimizando a su vez la exposición del plásmido a una desnaturación irreversible. El RNA se degrada por acción de la RNasa A. Las proteínas, el DNA cromosomal y los restos celulares son precipitados debido a la alta concentración de sales empleadas.

En las columnas de QIAgen, el DNA plasmídico es adsorbido en una columna de resina de intercambio aniónico, constituida por dietilaminoetilo (DEAE, Fig. 13), en condiciones ácidas la resina se carga positivamente e interacciona con los grupos fosfatos del DNA

plasmídico a través de interacciones electrostáticas. Las endonucleasas y sales son removidas mediante lavados. El DNA se eluye a pH básico (7.0-8.0) en condiciones de bajas concentraciones de sal y en pequeños volúmenes.

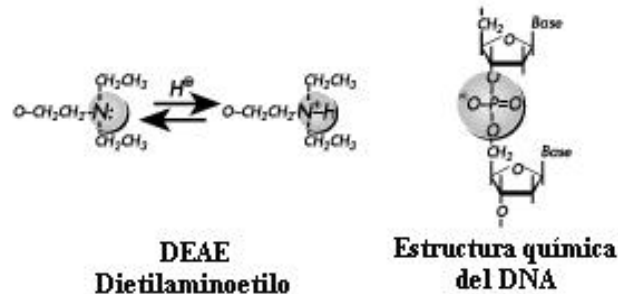


Figura 13. Grupos funcionales que interactúan en una purificación de DNA por columna.

El protocolo sugerido por el fabricante utilizando una microcentrífuga es el siguiente:

- 1.- Colectar 2ml del cultivo de interés saturado por centrifugación a 14000 rpm. Resuspender las células en 250 µl de buffer P1 (100 µg/ml RNasa A; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA) hasta obtener una solución homogénea.
- 2.- Agregar 250 µl de buffer P2 [200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)] a la suspensión celular, mezclar invirtiendo el tubo gentilmente hasta obtener una solución viscosa y clara.
- 3.- Agregar 350 µl de buffer N3 (3.0 M CH₃COOH (ácido acético, pH 5.5), mezclar en vortex 10 seg.
- 4.- Centrifugar por 10 min a 14,000 rpm.
- 5.- Transferir el sobrenadante a una columna QIAprep de QIAgen.
- 6.-Centrifugar 1min a 14,000 rpm y descartar el filtrado.
- 7.-Lavar la columna agregando 750 µl de buffer PE (etanol al 70%) y centrifugando de 30 a 60seg.
- 8.-Descartar el filtrado y centrifugar por 1 min más para remover residuos del buffer de lavado.
- 10.- Colocar una columna QIAprep en un tubo de microcentrífuga limpio. Para eluir añadir 50 µl de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o H₂O bidestilada al centro de la columna, incubar por 1 min y centrifugar por 1 min a 14,000 rpm.
- 11.-Almacenar los plásmidos obtenidos a 4 °C.

2.6.3 Obtención de RNA total

La purificación de RNA total se llevó a cabo por dos técnicas, la primera por extracción de RNA empleando un kit comercial para llevar a cabo los experimentos de RT-PCR y 5'-RACE o por purificación mediante extracciones con fenol caliente y cloroformo para los experimentos de microarreglos.

2.6.3.1 Kit RNeasy de QIAgen

La técnica de purificación de RNA mediante el uso del kit RNeasy de QIAgen utiliza una combinación de las propiedades de unión de los ácidos nucleicos a membranas de sílica gel ya antes mencionadas y el uso de centrifugación a alta velocidad. Un sistema de uso de buffers de altas concentraciones de sales permite la purificación de mas de 100 µg de RNA de mas de 200 bases de longitud para poder ser unidos a la membrana de silica de las columnas de RNeasy. Las células primeramente son lisadas y homogeneizadas en presencia de un buffer desnaturizante que contiene tiocianato de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{HSCN}$), el cual inmediatamente inactiva las Rnasas presentes en la muestra para asegurar la purificación de RNA intacto. Se utiliza etanol para proveer condiciones apropiadas de union y entonces la muestra se hace pasar por una columna RNeasy, donde el RNA total es adsorbido a la membrana y los contaminantes son eliminados eficientemente a través de lavados. El RNA obtenido es de alta calidad y se eluye de la columna en 30–100 µl de agua libre de Rnasas. Este procedimiento ofrece una muestra de RNA rica en mRNA, puesto que la mayoría de los RNAs menores a 200 nucleótidos, es decir los rRNA y tRNA, son excluidos selectivamente.

El protocolo sugerido por el fabricante utilizando una microcentrífuga es el siguiente

- 1.-A partir de un O.N. se crece un cultivo de la cepa de interés hasta densidad óptica de 0.5 a 600 nm.

- 2.- Se centrifugan 2ml de cultivo a 14000 rpm en una microcentrífuga y se elimina el sobrenadante.
- 3.- El pellet de células se resuspende en 100 μ l de buffer TE + lisozima empleando el vortex y se incuba 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Se agregan 350 μ l de Buffer RLT + β -mercaptoetanol y se mezcla vigorosamente en el vortex, sin dejar material insoluble.
- 5.- Se agrega a cada tubo 250 μ l de etanol absoluto y se mezcla pipeteando. No se debe centrifugar ni vortexear.
- 6.- Agregar 30 μ l de solución de DNAsa I (0.91 unidades/ml) e incubar 15 minutos a 25°C.
- 7.- Se transfiere a una columna RNeasy y se centrifuga a 14000 rpm durante 15 segundos exactamente. Se elimina el filtrado.
- 8.- Se agregan 700 μ l de buffer RW1 a la columna y se centrifuga a máxima velocidad durante 15 segundos descartando el filtrado (lavado del RNA).
- 9.- Transferir la columna a un tubo de recolección nuevo y agregar a la columna 500 μ l de buffer RPE. Centrifugar a máxima velocidad durante 15 segundos (segundo lavado).
- 10.- Hacer un tercer lavado con 500 μ l de Buffer RPE y centrifugar 2 minutos a máxima velocidad para que se seque la membrana.
- 11.- Pasar la columna a un nuevo tubo de recolección y centrifugar un minuto adicional.
- 12.- Transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y adicionar 30 μ l de H₂O libre de RNAsa a la columna. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad para eluir.
- 13.- Cuantificar el RNA purificado a 260 nm. (5 ml de RNA en 995ml de H₂O) donde:
1 Unidad de Absorbancia = 40 μ g RNA / μ l.
- 14.- El RNA se guarda a - 70 °C.

2.6.3.2 Fenol caliente

Para purificar el RNA empleado en los microarreglos, se empleó el método de fenol caliente cuyo protocolo se describe a continuación:

- 1.- Inocular 30 ml de cultivo con 0.3 ml de cultivo fresco. Crecer hasta fase logarítmica o fase deseada.

- 2.- Cosechar las células por centrifugación en tubos COREX de 30 ml a 10,000 rpm en rotor SS-34 a 4°C durante 5 minutos.
- 3.- Mantener el tubo con la pastilla bacteriana en hielo y sin sacarlo resuspender en 1/10 (3 ml) de su volumen en solución de lisis (sin usar vórtex).
- 4.- Calentar a 70°C durante 1 minuto en baño maría para lisar las células.
- 5.- Agregar un volumen (3 ml) de fenol saturado a 65°C y agitar 10 minutos de 200 a 300 rpm en una incubadora a 65°C.
- 6.- Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Sin mezclar las fases, sumergir el tubo en baño maría a 65°C y con una pipeta pasteur estéril sacar la fase acuosa superior (donde va el RNA) y pasarla a otro tubo.
- 8.- Repetir dos veces más los pasos 5,6 y 7, para un total de tres extracciones.
- 9.- Extraer una vez con un volumen de cloroformo : isoamílico (24:1)
- 10.- En la última extracción, tomar la fase acuosa y añadir 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.5 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 11.- Mezclar muy bien y precipitar a -20°C toda la noche.
- 12.- Centrifugar a 10,000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- 13.- Desechar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 400 µl de agua.
- 14.- Reprecipitar en eppendorf y centrifugar a 14,000 rpm 15 minutos en el cuarto frío y lavar con etanol al 70%.
- 15.- Resuspender en 150 µl de agua y hacer una dilución 1:500 (2 µl RNA en 998 µl de agua). Obtener la OD260 y OD280 nm. La relación 260/280 nm debe ser entre 2 y 2.2. Una unidad de absorbancia equivale a 40 µg/ml de RNA
- 16.- Guardar a -20°C en etanol o a -70°C en agua.

Soluciones y Reactivos:

1.- Solución de lisis

Acetato de sodio 20 mM pH 5.5

EDTA 1 mM

SDS 0.5%

Esterilizar en autoclave.

- 2.- Fenol bidestilado. Saturar el fenol con Acetato de sodio 20 mM pH 5.5 y EDTA 1 mM, esterilizado previamente en autoclave.
- 3.- Acetato de sodio 3M pH 5.5
- 4.- Etanol absoluto
- 5.- Etanol al 70%
- 6.- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)

2.6.4 RT-PCR

El RT-PCR es un método enzimático de síntesis *in vitro* de múltiples copias en forma de DNA, de una secuencia específica de RNA que involucra la síntesis de cDNA mediante el uso de una transcriptasa reversa y posteriormente la amplificación de los fragmentos de interés a través de una reacción de PCR.

Para llevar a cabo este experimento se requiere partir de un RNA libre de DNA para la síntesis de cDNA, el cual fue purificado por el método de RNeasy de QIAGEN descrito anteriormente. El RNA se digirió con la enzima de restricción *Sau3AI* para eliminar por completo el DNA contaminante.

Para sintetizar el cDNA empleamos el kit Omniscript® de QIAGEN (Fig. 14). A partir del RNA purificado se sintetiza el cDNA empleando una enzima transcriptasa reversa, posteriormente se degrada el RNA templado con Rnasa H y el cDNA obtenido es utilizado en las reacciones de PCR.

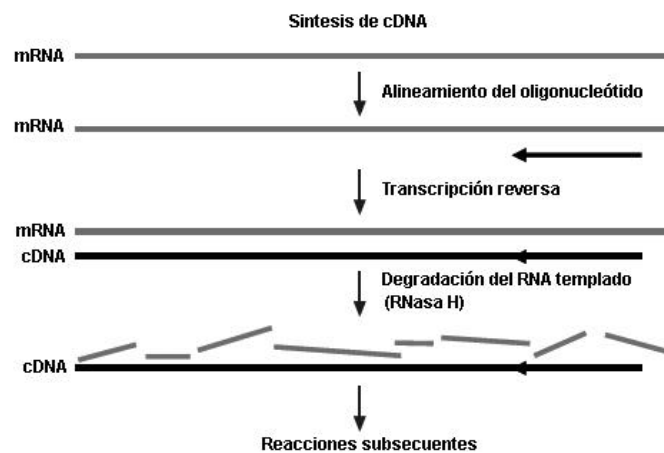


Figura 14. Obtención de cDNA a partir de RNA puro.

2.6.5 Determinación del inicio de la transcripción por el método de 5'-RACE

Para determinar el inicio de la transcripción del operón *yddV-dos*, se purificó RNA total de la cepa MC4100/p Φ (*yddV-lacZ*)_L de cultivos crecidos aeróbicamente en fase exponencial y estacionaria, purificado con el kit RNeasy de QIAgen. Se siguió el protocolo del kit 5'-RACE de Invitrogen sugerido por el fabricante. El RNA purificado se empleó para sintetizar cDNA empleando el kit Omniscript de QIAgen antes descrito y el oligonucleótido lacZrev que alinea en el gen *lacZ* de la fusión Φ (*yddV-lacZ*). Se empleó la cepa que tiene el plásmido con dicha fusión para enriquecer la muestra de mRNA que contiene el promotor del operón *yddV-dos*. La síntesis de cDNA inicia con el oligonucleótido lacZrev y termina en el inicio de la transcripción del operón pues es donde finaliza el mensajero. El RNA templado es degradado por la mezcla de Rnasas (RnasaH y Rnasa T1) proporcionada en el kit. Posteriormente se adiciona una cadena de guaninas en el extremo 3' del cDNA (el extremo del inicio de la transcripción) mediante la acción de la enzima Deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Finalmente se hacen dos reacciones de PCR para amplificar el fragmento, la primera reacción empleando el oligonucleótido lacZrev, y un oligonucleótido adaptador rico en guanina e inosina (AAP). La segunda ronda de PCR se realiza con un oligonucleótido interno (yh-PE) y otro adaptador (AUAP). Los oligonucleótidos adaptadores están incluidos en el kit de 5'-RACE. Finalmente el fragmento obtenido es secuenciado para encontrar el nucleótido previo a la cadena de guaninas que es el nucleótido correspondiente al inicio de la transcripción del operón *yddV-dos*.

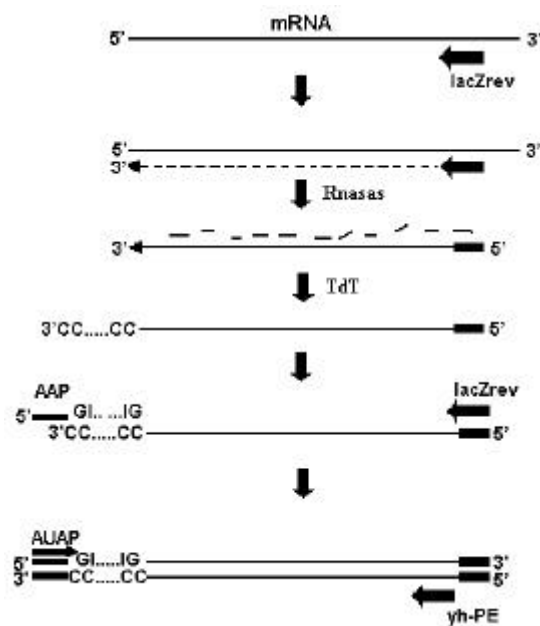


Figura 15. Protocolo esquematizado del experimento de 5'-RACE.

2.6.6 Electroforesis de DNA

Todas las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TE (1X) y corridos en el mismo buffer a 90V. Como buffer de carga se empleó una solución que contiene lo siguiente:

Componente	Concentración final
EDTA	1 mM
Azul de bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol	30.0%

Tabla 7. Fórmula del buffer de carga para electroforesis.

2.6.7 Electroforesis de RNA

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio a una concentración final de $1\mu\text{g/ml}$ y tiocianato de guanidina ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{HSCN}$) 20mM. Las electroforesis de RNA se realizaron a 50V.

2.6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es empleada para amplificar exponencialmente *in vitro* una secuencia específica de nucleótidos en presencia de una secuencia templado, dos oligonucleótidos que sirven para iniciar la elongación, que alinean en las cadenas opuestas y flanquean la región de interés del DNA blanco, además de una DNA polimerasa termoestable. La reacción es en ciclos que involucran la desnaturalización del templado, el alineamiento del oligonucleótido y la extensión de estos oligonucleótidos por acción de la DNA polimerasa hasta lograr suficientes copias del fragmento para posterior análisis.

Por lo general se empleó Taq polimerasa de Invitrogen® y en los casos de amplificación de fragmentos para clonación y secuenciación se empleó Pfx supermix de Invitrogen®.

2.6.9 Reacciones de digestión con enzimas de restricción y reacciones de ligación de DNA

Las enzimas de restricción empleadas y sus respectivos amortiguadores fueron de Invitrogen®, Promega® y/o New England Biolabs®. Para las reacciones de ligasa se empleó la T4 DNA ligasa de Invitrogen® y las reacciones se realizaron a 14°C durante 16 horas.

2.6.10 Transformación de células de *E. coli*

E. coli puede llegar a ser artificialmente competente mediante técnicas como la de CaCl_2 /choque térmico y la de electroporación. En el proceso de transformación, la bacteria ingresa moléculas de DNA desnudo. Si el DNA introducido (DNA extraño) tiene un origen de replicación reconocido por las DNA polimerasas de la célula huésped, entonces la bacteria replicará el DNA extraño a la par con la replicación de su propio DNA. Las bacterias que son capaces de ingresar DNA extraño son llamadas células competentes y se logran obtener por el tratamiento con CaCl_2 en la fase temprana logarítmica del crecimiento. La bacteria es permeable a los iones Cl^- pero no a los iones Ca^{2+} . El mecanismo exacto de cómo entra el DNA a la bacteria no es claro aún, pero se sabe que un choque térmico a 42°C da lugar a la expresión de genes de respuesta a choque térmico, necesarios para el ingreso del DNA extraño a la célula.

2.6.10.1 Transformación por el método de CaCl_2

Para la transformación por el método de CaCl_2 seguimos el siguiente protocolo:

- 1.- Inocular 300 μl de un cultivo ON en 30 ml de LB + el antibiótico indicado si procede.
- 2.- Incubar a 37°C de 2 a 3 horas o hasta que el cultivo alcance la fase exponencial ($\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0.4-0.6).
- 3.- Centrifugar el cultivo a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender la pastilla de células (pellet) en 5 ml de CaCl_2 100 mM frío.
- 5.- Incubar en hielo 40 minutos.
- 6.- Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C .
- 7.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet el 500 μl de CaCl_2 100 mM frío.
- 8.- Mezclar en tubos eppendorf 30 μl de células mas 3 μl de DNA.
- 9.- Incubar en hielo 1 hora.
- 10.- Incubar a 43°C por 90 segundos.
- 11.- Inmediatamente agregar 1 ml de LB.
- 12.- Incubar a 37°C durante una hora con agitación.

- 13.-Centrifugar a 14,000 rpm 5 minutos.
- 14.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 80 µl de MgSO₄ 10 mM.
- 15.- Platear en cajas de LB con el antibiótico correspondiente.
- 16.- Incubar a 37°C toda la noche.

2.6.10.2 Transformación por electroporación

- 1.- Inocular 300 µl de un cultivo ON en 30 ml de LB + el antibiótico indicado si procede.
- 2.- Incubar a 37°C de 2 a 3 horas o hasta que el cultivo alcance la fase exponencial (OD_{600nm} = 0.4-0.6).
- 3.- Centrifugar el cultivo a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender el pellet en 1.5 ml de Glicerol 10% frío y pasarlo un tubo eppendorf.
- 5.- Centrifugar a 14,000 rpm/1min a 4°C.
- 6.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1.5 ml de Glicerol 10% frío.
- 7.- Centrifugar a 14,000 rpm/1min a 4°C.
- 8.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1.5 ml de Glicerol 10% frío.
- 9.- Centrifugar a 14,000 rpm/1min a 4°C.
- 10.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 µl de Glicerol 10% frío.
- 11.- Mezclar en tubos eppendorf 40 µl de células mas 3 µl o 5 µl de DNA.
- 12.- Electroporar usando celdas de electroporación apropiadas y el programa para bacterias del electroporador a utilizar.
- 13.- Recuperar las células con 1 ml de medio LB y pasar a tubos Eppendorf.
- 14.- Incubar a 37°C con agitación durante 2 horas.
- 15.- Centrifugar a 14,000 rpm 1min a 4°C.
- 16.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 80 µl de MgSO₄ 10 mM.
- 17.- Platear en cajas con el antibiótico correspondiente, si procede.
- 18.- Incubar a 30°C o 37°C toda la noche.

2.6.11 Transducción generalizada de *E. coli* con el bacteriófago P_{1vir}

La transducción generalizada utiliza la habilidad de ciertos fagos para transferir material genético al cromosoma de una bacteria. Algunos fagos son capaces de movilizar genes bacterianos y acarrearlos de una célula bacteriana a otra a través de un proceso llamado transducción. Se utilizó el bacteriófago P_{1vir} que es una variedad del fago P₁ incapaz de formar lisógenos.

2.6.11.1 Obtención de lisados con el bacteriófago P_{1vir}

El protocolo para la obtención de lisados de las células donadoras es el siguiente:

- 1.- Preparar un cultivo ON de la cepa donadora en 3 ml de Lb + CaCl₂ 5 mM + el antibiótico correspondiente.
- 2.- Centrifugar 1.5 ml del ON de la cepa donadora a 14,000 rpm durante 2 minutos.
- 3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en la mitad del volumen (750 µl) con LB + CaCl₂ 5mM.
- 4.- Mezclar en tubos de ensayo 100 µl de células donadoras + 10 µl de fago P_{1vir}.
- 5.- Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- 6.- Agregar 3ml de medio LB + CaCl₂ 5 mM.
- 7.- Incubar a 37°C durante 4 horas o hasta que se observe la lisis en los cultivos. Se utiliza un tubo control sin fago para verificar la lisis.
- 8.- Centrifugar los cultivos a 14,000 rpm durante 5 min.
- 9.- Recuperar el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo.
- 10.- Agregar 2 gotas de CHCl₃ con una pipeta Pasteur y mezclar vigorosamente en vortex.
- 11.- Almacenar los lisados a 4°C.

2.6.11.2 Transducción mediada por P_{1vir}

El protocolo para la transducción es el siguiente:

- 1.- Preparar un cultivo ON de la cepa a transducir (receptora) en medio LB + CaCl₂ 5 mM mas el antibiótico correspondiente.
- 2.- Centrifugar 1.5ml del cultivo ON a 14,000 rpm durante 5 minutos.
- 3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en la mitad del volumen (750 ml) con LB + CaCl₂ 5mM.
- 4.- Mezclar en tubos de ensayo 100 µl de células receptoras + 10 µl de lisado de la cepa donadora.
- 5.- Incubar a 37°C durante 20 min.
- 6.- Agregar 1 mL de LB para interrumpir la infección y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
- 7.- Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1ml de LB tres veces para eliminar los restos de fago.
- 8.- Resuspender el pellet en 1mL de LB e incubar a 37°C durante una hora.
- 9.- Centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
- 10.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 80 µl de LB.
- 11.- Platear en cajas con el antibiótico correspondiente.
- 12.- Incubar a 37°C toda la noche.

2.6.12 Construcción de fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ*

Para analizar la expresión de los genes *yddV* y *dos* se construyeron fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ* mediante el método reportado por Elliott (88). Las fusiones se construyeron amplificando por PCR las regiones promotoras a estudiar (Fig. 16), empleando oligonucleótidos que contienen los sitios *EcoRI* y *BamHI* para ser clonados en el plásmido pRS551. Se construyeron tres fusiones, una fusión $\Phi(dos-lacZ)$ la cual incluye como zona promotora un fragmento de 1153 pb de la región río arriba del gen *dos*. También se construyeron dos fusiones para analizar la expresión de *yddV*, una fusión corta $\Phi(yddV-lacZ)_C$ la cual comprende una probable región reguladora de 886 pb y otra larga $\Phi(yddV-lacZ)_L$ con una probable región reguladora de 2240 pb.

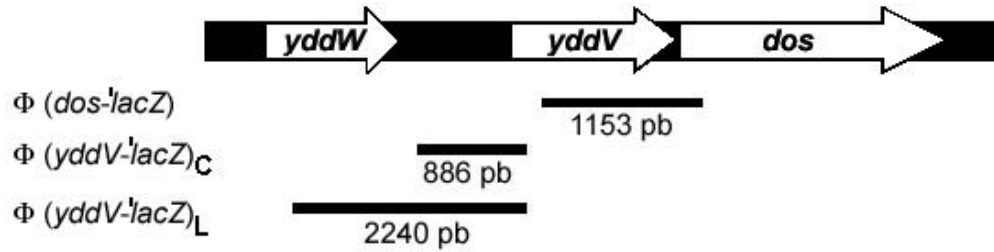


Figura 16. Regiones reguladoras empleadas para la construcción de las fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ* para el análisis de expresión de los genes *yddV* y *dos*.

Los fragmentos amplificados para ser clonados en el plásmido pRS551 se verificaron por PCR (Fig. 17):

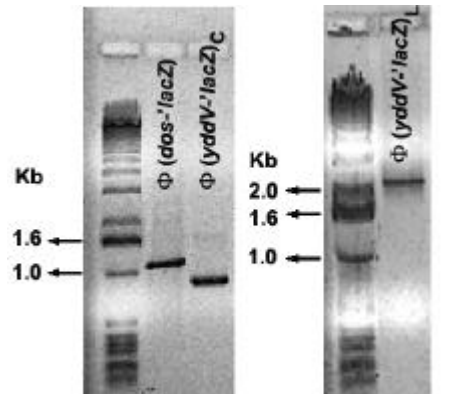


Figura 17. Fragmentos amplificados por PCR de las zonas promotoras para la construcción de las fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ*.

Los plásmidos obtenidos que contienen cada una de las fusiones son transformados a la cepa TE2680 (Tabla 2), una cepa mutante en el gen *recD*, la cual tiene el operón del triptófano modificado, de tal forma que comparte regiones homólogas a regiones del plásmido pRS551 (un casete de resistencia a kanamicina y los genes *lacZ* y *lacY*) que permiten la inserción al cromosoma de las fusiones por recombinación homóloga con el plásmido previamente linearizado con la enzima *XhoI* (Fig. 18), sustituyendo un casete de resistencia a cloramfenicol de la cepa TE2680 por la fusión construida en el plásmido.

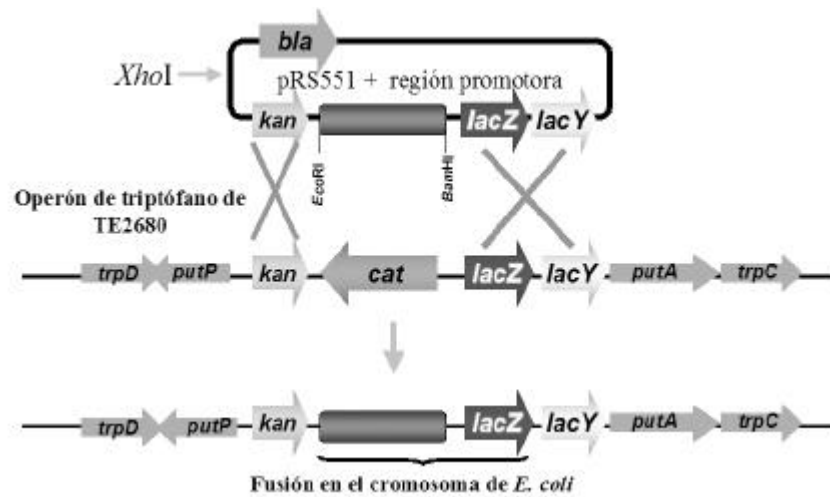


Figura 18. Diagrama de la construcción de fusiones transcricionales con el gen reportero *lacZ* (88).

Las fusiones en el cromosoma se verificaron por PCR y posteriormente se transdujeron a la cepa MC4100 para estudiar su expresión.

2.6.13 Mutagénesis dirigida por recombinación homóloga

Para la mutagénesis dirigida empleada para reemplazar el gen *dos* o el operón *yddV-dos* por el casete de resistencia a kanamicina empleamos el método de mutagénesis por recombinación homóloga.

La construcción de la mutante $\Delta dos::kan$ se realizó clonando un casete de resistencia a kanamicina (1.3 kb) obtenido por digestión con la enzima *BamHI* del plásmido pUC4K-KIXX de Pharmacia®, flanqueado por las regiones adyacentes (aprox. 1 kb) del gen *dos* obtenidas por PCR en el plásmido pUC18 y pTZ19R (ver tabla 3) para generar los plásmidos pMM4 y pMM5 respectivamente. Estos plásmidos fueron linearizados con la enzima *EcoRI* y transformados a la cepa JC7623 (*recBCD*) la cual recombina DNA lineal eficientemente en su cromosoma, de acuerdo con lo reportado por Winans, S, *et al* (91). La mutación $\Delta dos::kan$ fue transducida a las cepas deseadas por transducción con el fago P_{1vir} . En esta mutagénesis, se amplificaron mediante PCR las zonas flanqueantes del gen *dos*, las

cuales se denominaron L (*Pst*I-Left-*Bam*HI) y R (*Bam*HI-Right-*Eco*RI), empleando primers que contienen sitios de restricción que son empleados para clonar estos amplificados en los vectores pUC18 y pTZ19R. Posteriormente se clonó el casete de kanamicina entre los fragmentos L y R dentro del plásmido (Fig. 19). El casete de kanamicina se obtuvo a partir del plásmido pUC4K mediante una digestión con *Bam*HI, cuyos sitios de restricción se emplearon también en la clonación.

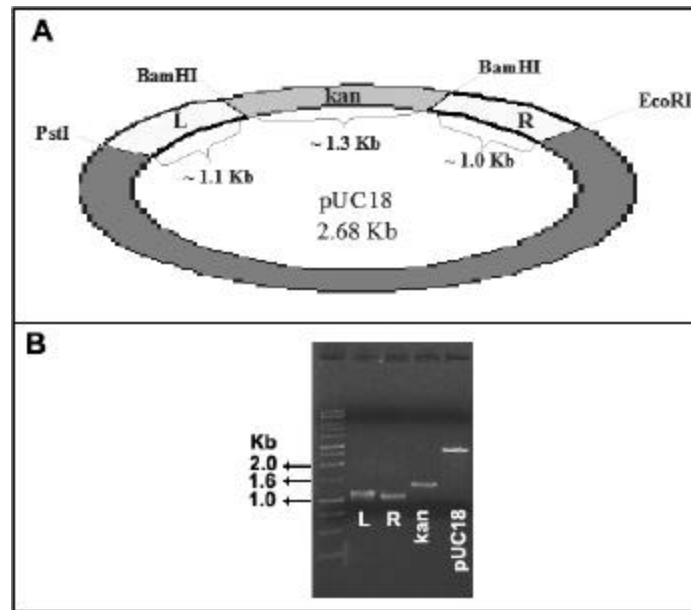


Figura 19. Construcción del fragmento L-kan-R en el plásmido pUC18. A) Esquema de clonación de los fragmentos L, kan y R en el plásmido pUC18 empleando los sitios *Pst*I, *Bam*HI y *Eco*RI. B) Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio, mostrando los fragmentos L, R, *kan* y el plásmido pUC18 digeridos con las enzimas correspondientes.

Obtuvimos la construcción L-kan-R en los plásmidos pUC18 y pTZ19R y se verificó que la construcción fuera correcta con digestiones de los plásmidos con las mismas enzimas empleadas para la clonación (Fig. 20).

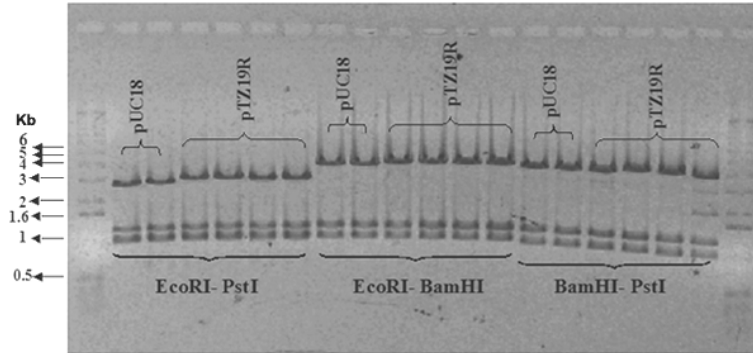


Figura 20. Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio, mostrando los productos de digestión de los plásmidos con la construcción L-kan-R.

Con los plásmidos que contienen la construcción L-kan-R se transformó la cepa XL1-blue con el fin de amplificar el número de plásmidos que contienen la construcción. Estos plásmidos se purificaron y se linearizaron mediante digestión con la enzima *EcoRI* y con este DNA se transformó la cepa JC7623 (*recBCD*) para reemplazar el gen *dos* mediante recombinación homóloga por el casete de resistencia a kanamicina. Las colonias Kan^r Amp^s seleccionadas fueron aquellas en las que se llevó a cabo el evento de recombinación.

La construcción de la mutante $\Delta yddV$ -*dos*::*kan* se realizó mediante la construcción de un fragmento de DNA que contiene un casete de kanamicina proveniente de la cepa JMH1232 (ver tabla 1) flanqueado por 500 pb de bases de las regiones adyacentes al operón. Este fragmento (L-kan-R) es obtenido por reacciones consecutivas de PCR. Posteriormente el fragmento L-kan-R de aproximadamente 2.2 kb es utilizado para transformar la cepa MG1655 que contiene un plásmido Red (pKOBEG, pKOBEGA o pKD46, ver tabla 3), que codifican las funciones λ -Red del bacteriófago λ . Este sistema Red incluye tres genes, γ , β y *exo*, cuyos productos son llamados Gam, Bet y Exo respectivamente. Gam inhibe la exonucleasa V del sistema RecBCD de la célula huésped y entonces, las proteínas Bet y Exo pueden ganar acceso a los extremos del fragmento de DNA (L-kan-R) para promover la recombinación (Fig. 21) (85,92).

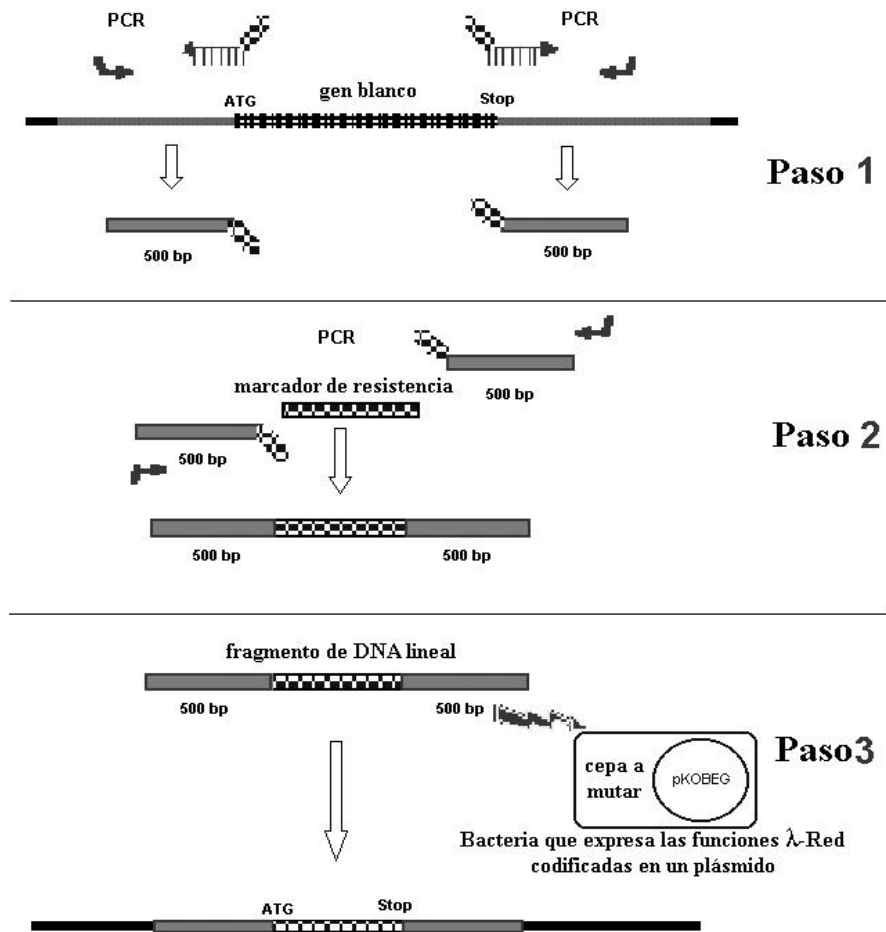


Figura 21. Esquema general de una mutagénesis por recombinación homóloga empleando las funciones λ -Red.

2.6.14 Southern blot

Las mutaciones $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$ fueron verificadas por PCR y Southern blot. En todos los experimentos de Southern blot se empleó el kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System de Amersham. El protocolo empleado es el proporcionado por el fabricante.

Digestión del DNA:

- 1.- Digerir el DNA (40 μ g) con las enzimas de restricción correspondientes.
- 2.- Incubar a 37°C por dos horas.

Electroforesis del DNA:

- 1.- Hacer una electroforesis con todo el DNA digerido, en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 80V.
- 2.- Posteriormente tomar una fotografía al gel utilizando una regla del lado del marcador de pesos.

Transferencia del DNA a la membrana de nylon por capilaridad:

- 1.- Lavar el gel con solución depurinizadora e incubar en agitación lenta por 12 minutos, hasta observar el vire del azul de bromofenol a amarillo por el incremento de la acidez.
- 2.- Hacer un lavado del gel con agua bidestilada para eliminar la solución depurinizadora y posteriormente lavar el gel con la solución desnaturalizadora. Incubar en agitación lenta por 25 minutos y el azul de bromofenol regresa al color azul.
- 3.- Hacer un lavado del gel con agua bidestilada para eliminar la solución desnaturalizadora y cubrir el gel con solución neutralizadora e incubar en agitación lenta por 30 minutos.
- 4.- Lavar el gel con agua bidestilada para eliminar la solución neutralizadora.
- 5.- El DNA se transfiere a una membrana de nylon HybondTM N⁺ durante 5 horas. La fracción móvil para el sistema de capilaridad empleado en la transferencia es Buffer SSC 20X. El esquema del sistema de capilaridad es el siguiente:

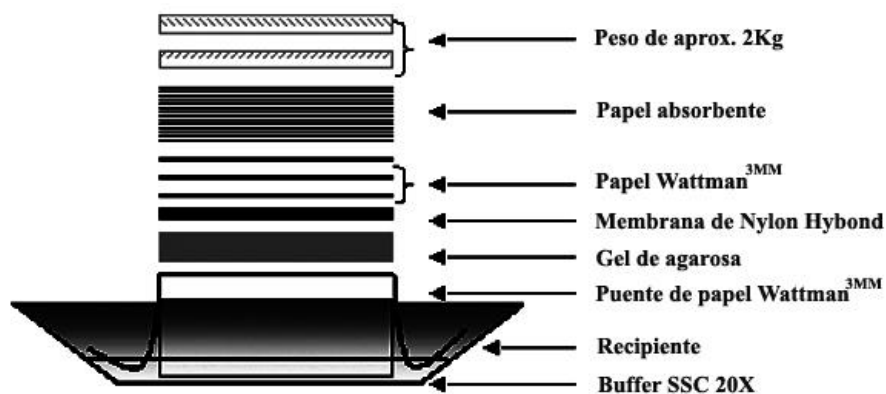


Figura 22. Esquema del sistema de capilaridad empleado para la transferencia de DNA a una membrana de Nylon en un experimento de Southern blot.

Preparación del Buffer de hibridación:

- 1.- Se requieren 0.25 ml de buffer Gold Hybridization Buffer ECL por cada cm^2 del recipiente usado o si el gel es de 8 x 11 cm preparar 30 ml de buffer que es suficiente para cubrirlo en una caja chica.
- 2.- En agitación se adiciona al buffer NaCl hasta lograr una concentración final de 0.5M.
- 3.- Posteriormente se agrega a la solución en agitación el agente bloqueador hasta una concentración de 5% peso/volumen y mantener en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Preparación de la sonda:

- 1.- La sonda se prepara una vez concluida la pre-hibridación. La sonda se requiere a una concentración aproximada de $10\text{ng}/\mu\text{l}$.
- 2.- $10\ \mu\text{l}$ de sonda se desnaturalizan en baño maría a 100°C durante 5 minutos.
- 3.- Inmediatamente se incuba la sonda en hielo durante 5 minutos para mantener la desnaturalización del DNA.
- 4.- Centrifugar 10 seg para colectar toda la sonda desnaturalizada en el fondo de un tubo Eppendorf y posteriormente agregar $10\ \mu\text{l}$ de reactivo de marcaje mezclando con la pipeta.
- 5.- Agragar $10\ \mu\text{l}$ de glutaraldehido y mezclar con la pipeta.
- 6.- Incubar a 37°C durante 10 min.

Hibridación:

- 1.- Una vez transferido el DNA, se elimina el peso y todo el material absorbente empleado en la transferencia. Los pozos se marcan en la membrana con un bolígrafo.
- 2.- El DNA se fija a la membrana con luz UV.
- 3.- Se hace una pre-hibridación de la membrana incubándola durante 20 minutos a 42°C con el buffer de hibridación.
- 4.- Una vez concluida la pre-hibridación, se procede a incorporar la sonda marcada y se incuba a 42°C durante 4 horas con agitación suave.

Lavado de la membrana y exposición:

- 1.- Eliminar por decantación el buffer de hibridación el cual puede ser reutilizado para la misma sonda.
- 2.- Cubrir la membrana con buffer primario de lavado precalentado a 55°C e incubar en agitación por 10min a 55°C. Realizar este lavado 2 veces.
- 3.- Cambiar de recipiente la membrana y cubrirla con buffer secundario de lavado e incubar en agitación por 5 min a temperatura ambiente. Realizar este lavado 2 veces.
- 4.- Cambiar de recipiente la membrana eliminando lo mas que se pueda del buffer de lavado. 3. Agregar sobre la membrana del lado del DNA una mezcla de volúmenes iguales del Reactivo de Detección 1 con el Reactivo de Detección 2. La cantidad empleada de esta mezcla es de 0.125 ml/cm² de membrana. Incubar 1 min a temperatura ambiente.
- 5.- Exponer la membrana a una placa autoradiográfica para detectar la emisión de luz y revelar.

Solución	Componentes
Solución depurinizadora	HCl 250mM
Solución desnaturalizadora	NaCl 1.5M NaOH 0.5M
Solución neutralizadora	NaCl 1.5M Tris.HCl 0.5M pH = 7.5
Buffer SSC 20X	Citrato de sodio 0.3M
Buffer de hibridación ECL Gold	NaCl 0.5M Agente bloqueador 0.5% peso/volumen
Buffer primario de lavado	SDS 0.4% SSC 0.5%
Buffer secundario de lavado	SSC 20%

Tabla 8. Soluciones empleadas en los ensayos de Southern blot.

2.6.15 Microarreglos de DNA

Los microarreglos se realizaron en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. GenArise fue el software empleado para el análisis de datos; este software desarrollado en el IFC se obtuvo de la página de internet (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

2.6.16 Clonación del gen *yddV*

Para la clonación del gen *yddV*, amplificamos el gen de 1.4 kb, a partir de DNA cromosomal de la cepa MC4100, empleando la polimerasa *Pfx* Supermix de Invitrogen® de alta fidelidad para evitar mutaciones en la amplificación. Los oligonucleótidos empleados (*yddV*-*Nco*I-5' y *yddV*-*Sac*I-3') contienen los sitios de restricción de las enzimas *Nco*I y *Sac*I (ver materiales y métodos), los mismos sitios que empleamos en la ligación del fragmento amplificado en el plásmido pSE420 de Invitrogen® digerido con las mismas enzimas *Nco*I y *Sac*I (Fig. 23).

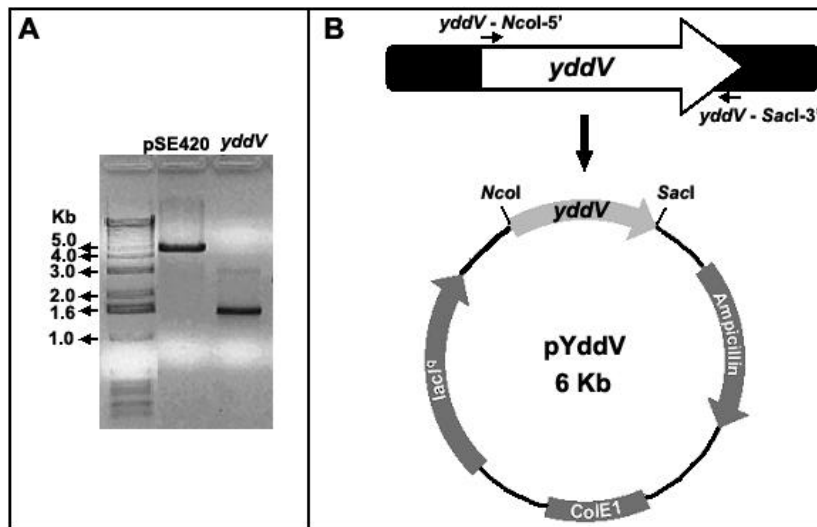


Figura 23. Construcción del plásmido pYddV. A) Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio donde se muestra el vector de clonación pSE420, y el gen *yddV* amplificado por PCR, empleados en la clonación. B) Diagrama del plásmido pYddV construido por la ligación del gen *yddV* en el vector pSE420 en los sitios de restricción *Nco*I y *Sac*I.

El producto de ligación se transformó en la cepa XL1-blue para seleccionar las clonas correctas. En la transformación se obtuvieron varias colonias de las cuales se purificó el plásmido. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con la enzima *Bgl*I para identificar aquellos con el inserto de *yddV* (Fig. 24).

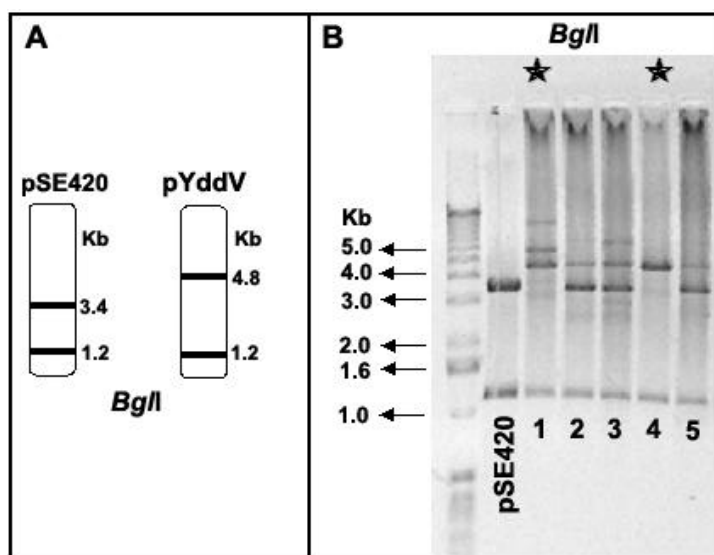


Figura 24. Selección de las clonas de *yddV*. A) Diagrama de los fragmentos esperados para los plásmidos pSE420 y pYddV digeridos con la enzima *Bgl*I. B) Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio donde se muestra la digestión con la enzima *Bgl*I de los plásmidos candidatos con el gen *yddV*. Como control se empleó el vector pSE420. Los plásmidos 1 y 4 marcados con una estrella muestran el patrón de digestión esperado para el plásmido pYddV.

Se obtuvieron dos plásmidos con el patrón de digestión esperado con la enzima *Bgl*I llamados pYddV1 y pYddV4. Estos plásmidos se analizaron por digestión con las enzimas *Nco*I, *Nco*I-*Sac*I, *Hind*III, *Nco*I-*Hind*III y *Nco*I-*Bgl*I para verificar que tienen el inserto de *yddV* (Fig. 25).

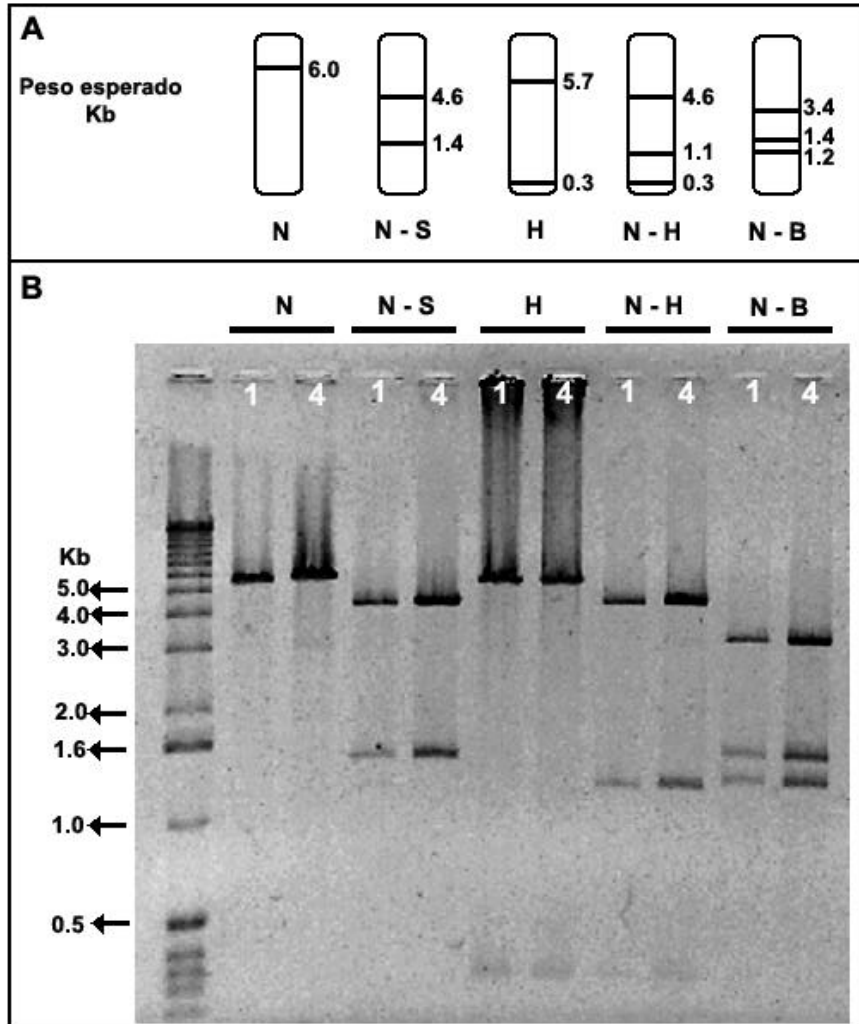


Figura 25. Análisis de digestión de los plásmidos pYddV1 y pYddV4 con una o dos enzimas de restricción. A) Pesos esperados para los plásmidos digeridos con las enzimas *NcoI* (N), *NcoI-SacI* (N-S), *HindIII* (H), *NcoI-HindIII* (N-H) y *NcoI-BglI* (N-B). B) Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñido con bromuro de etidio de los productos de digestión de los plásmidos pYddV1 (1) y pYddV4 (4) con las enzimas descritas en A).

Se obtuvo la secuencia del inserto en ambas hebras de los plásmidos pYddV1 y pYddV4 en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para verificar que no tuvieran mutaciones. Ambos plásmidos tienen el gen *yddV* clonado correctamente en fase y sin mutaciones. Solamente empleamos el plásmido pYddV1 para los análisis posteriores, el cual denominamos solamente pYddV.

2.6.17 Bases de datos empleadas en los análisis *in silico*

GCG Wisconsin Package, NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>)

Colibri server (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>)

GenArise software package (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>)

SwissProt web server (<http://ca.expasy.org/sprot/>)

2.7 Técnicas básicas de Bioquímica empleadas

2.7.1 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Para electroforesis de proteínas en la identificación de la sobreexpresión de YddV, empleamos la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Este método es comúnmente empleado para estimar la masa molecular relativa de una proteína o péptido, para determinar la abundancia relativa de proteínas mayoritarias en una muestra y para determinar la distribución de proteínas en un fraccionamiento o purificación de proteínas. El SDS es un detergente aniónico, lo que significa que cuando es disuelto, sus moléculas adquieren una carga neta negativa en un intervalo de pH. Una cadena polipeptídica puede unir ciertas moléculas de SDS en proporción a su masa molecular relativa. Las cargas negativas del SDS eliminan la mayoría de la estructura terciaria de las proteínas y son atraídas fuertemente hacia un ánodo (electrodo cargado positivamente) en un campo eléctrico. Al ser similar la proporción carga-masa de las proteínas, la separación final de las proteínas en un gel de poliacrilamida depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de éstas. El protocolo empleado para preparar los geles de acrilamida y hacer la electroforesis de proteínas para analizar la sobreexpresión de YddV es el siguiente:

2.7.1.1 Geles de proteínas

1.- Preparar el gel separador al 9 %

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.5 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	1.25 ml
SDS 10%	50 μ l
H ₂ O bidestilada	2.15 ml
Persulfato de Amonio 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

Tabla 9. Fórmula para la preparación de un gel de poliacrilamida al 9 %.

2.- Vaciar esta solución rápidamente en la cámara de electroforesis hasta 1 cm antes de los pozos y eliminar las burbujas con isopropanol.

3.- Dejar polimerizando por 45 minutos y eliminar el isopropanol por completo.

4.- Preparar el gel concentrador al 5%

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	500 μ l
Tris 0.5 M pH 6.8	750 μ l
SDS 10%	60 μ l
H ₂ O _d	1.7 ml
Persulfato de Amonio 10%	40 μ l
TEMED	4 μ l

Tabla 10. Fórmula para la preparación de un gel de poliacrilamida al 5 %.

5.- Vaciar esta solución rápidamente sobre el gel al 9% y colocar el peine.

6.- Dejar polimerizando por 45 minutos, retirar el peine y enjuagar los pozos con agua.

2.7.1.2 Preparación de las muestras

- 1.- Tomar 50 μ l del cultivo resuspendido en $MgSO_4$ 10 mM y centrifugar 5 minutos a 14,000 rpm.
- 2.- Resuspender el pellet en 20 μ l de Buffer colorante Laemmli con 5% de β -mercaptoetanol.
- 3.- Hervir las muestras a 100°C en baño María durante 5 minutos.
- 4.- Vaciar cada muestra en un pozo diferente y no olvidar poner el marcador de pesos.

Componente	Concentración final
Glicerol	10%
SDS	2.3%
TRIS-HCl (pH=6.8)	0.0625 M
β -mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0.001%

Tabla 11. Fórmula del buffer colorante Laemmli para cargar las muestras.

2.7.1.3 Electroforesis

- 1.- Correr la electroforesis en buffer Laemmli 1X a 70V hasta que las muestras pasen el gel concentrador y posteriormente a 100V hasta que las proteínas pasen por el gel separador.
- 2.- Desteñir el gel con solución desteñidora (90 ml metanol, 90 ml agua, 10 ml ácido acético glacial), dos veces por 45 minutos cada una o hasta observar las bandas en el gel.
- 3.- Pegar los geles en papel Wattmman y cubrirlos con un acetato para secarlos a 80°C al vacío por 1 hora.

2.7.2 Determinación de la actividad β -galactosidasa

La enzima β -galactosidasa hidroliza lactosa en glucosa y galactosa además de otros β -D-galactósidos. Esta enzima está codificada en el gen *lacZ* del operón *lac* de *Escherichia coli*,

el cual es un gen reportero comúnmente utilizado para monitorear la expresión de genes en fusiones recombinantes.

El ensayo de β -galactosidasa empleado es el descrito por J.H.Miller (90). En este ensayo, el sustrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) es utilizado en vez de lactosa como sustrato para la β -galactosidasa. Al hidrolizar el ONPG, se libera *o*-nitrofenol. Este compuesto tiene un color amarillo que absorbe a 420 nm de longitud de onda. Para medir la actividad de la enzima β -galactosidasa se monitorea la acumulación del color amarillo en función del tiempo (incremento de la absorbancia a 420nm por minuto).

El protocolo empleado para este ensayo es el siguiente:

- 1.- Preparar un cultivo ON de la cepa deseada.
- 2.- Inocular 50 μ l de los cultivos en 5 ml de LB e incubar a 37°C durante 1 hora
- 3.- Agregar Cloramfenicol para inhibir la síntesis de proteínas a una concentración final de 100 μ g/ml.
- 4.- Incubar 5 minutos a T ambiente
- 5.- Centrifugar en tubos Falcon 10 min / 3000 rpm / 4°C.
- 6.- Resuspender el pellet de células en 2.5 ml de NaCl al 0.8% Frío.
- 7.- Centrifugar en tubos Falcon 10 min / 3000 rpm / 4°C.
- 8.- Resuspender el pellet de células en 1.5 ml de Buffer Z con β - mercaptoetanol y medir DO a 600 nm..
- 9.- Preparar por triplicado cada cepa con lo siguiente:
 - a) 30 ml de células + 970 ml Buffer Z con β - mercaptoetanol
 - b) 50 ml de células + 950 ml Buffer Z con β - mercaptoetanol
 - c) 100 ml de células + 900 ml Buffer Z con β - mercaptoetanol

Emplear 1 ml de Buffer Z con β - mercaptoetanol como control.

10.- Agregar 2 gotas de CHCl_3 y 2 gotas de SDS al 0.1% con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El tubo control se trata de la misma forma.

11.- Incubar 10 minutos a T ambiente.

12.- Agregar 200 μ l de ONPG a 0.4% en intervalos de 30 segundos (para controlar el tiempo en cada tubo) y mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo.

13.- Incubar a T ambiente 20 minutos

14.- Agregar 500 μ l de Na_2CO_3 1M (tambi3n en intervalos de 10 segundos entre cada tubo) para detener la reacci3n del ONPG.

15.- Medir Absorbancia a 420 nm y 550 nm de las muestras y usar el control como blanco.

16.- Calcular la actividad β -galactosidasa expresada en Unidades Miller (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por funci3n de densidad 3ptica), de acuerdo a la siguiente f3rmula:

$$\text{UM} = 1000 [\text{DO}_{420\text{nm}} - (1.75 * \text{DO}_{550\text{nm}})] / [t * v * \text{DO}_{600\text{nm}}]$$
 donde:

t = tiempo de reacci3n (min)

v = volumen de c3lulas en suspensi3n (ml)

2.7.3 Extracci3n de c-di-GMP de c3lulas de *E. coli*

Para la extracci3n de c-di-GMP de c3lulas de *E. coli* empleamos el m3todo reportado por Weinhouse *et al.*, con algunas modificaciones (93).

Se parte de un cultivo de 1000 ml de LB + ampicilina 2 μ g/ml de la cepa que tiene el pl3smido pYddV, crecido hasta fase exponencial, aproximadamente a 0.3 de $\text{DO}_{600\text{nm}}$. Este cultivo se trata con IPTG a una concentraci3n final de 1 mM durante 3 horas. Las c3lulas se recuperan por centrifugaci3n y se lavan con agua bidestilada. El pellet de c3lulas se resuspende en 10ml de agua bidestilada y se sonicar hasta observar el rompimiento de las c3lulas. Posteriormente, las prote3nas totales se precipitan con HClO_4 0.6 M. Las prote3nas desnaturalizadas se remueven centrifugando a 35,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se neutraliza con una soluci3n 5M de K_2CO_3 a pH=6.0. El KClO_4 que precipita se remueve tambi3n por centrifugaci3n a 35,000 rpm durante 30 min y el sobrenadante (extracto) se filtra por una membrana MFTM (Millipore Acrodisk) de 0.25 μ m antes de analizar el extracto por HPLC.

2.7.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación de c-di-GMP por HPLC, empleamos una columna C-18 de fase reversa LiChrosorb de 250 x 4.6 mm. Las determinaciones se realizaron en un aparato de HPLC Waters Millennium, de toma de muestras automática y la detección se realizó a 252 nm. Para la cinética de producción de c-di-GMP se utilizó una columna Waters Bondapak® de 300 x 3.9 mm. Las determinaciones se hicieron a temperatura ambiente, empleando acetonitrilo como fase móvil y buffer de fosfatos NaH₂PO₄ 50mM a pH=6.0. Como estándar empleamos una solución de c-di-GMP a una concentración de 1 mg/ml. La velocidad del flujo fue de 1ml/min. La columna se equilibra con buffer de NaH₂PO₄ 50mM a pH=6.0 y las muestras se corren de acuerdo al siguiente gradiente:

Tiempo	% acetonitrilo	% NaH ₂ PO ₄
0	0	100
1	2	98
12	2	98
15	6	94
20	6	94
25	0	100

2.8 Otras técnicas

2.8.1 Ensayos de motilidad

Los ensayos de motilidad se realizaron en placas de tripton (1.3%), NaCl (0.7%), glucosa (0.2%) y agar (0.3%) de acuerdo al protocolo reportado por Takeda S, *et al.*, (94).

2.8.2 Determinación de formación de biofilm

Los ensayos de biofilm fueron llevados a cabo a 37°C empleando pozos de placas de PVC (Costar, Cambridge, MA) o en tubos de ensayo de vidrio de borosilicato, siguiendo el protocolo previamente descrito (95). Cada experimento se realizó por triplicado al menos

tres veces. Para evitar la evaporación del medio de cultivo se emplearon cajas de plástico para cubrir los pozos o tubos. Para visualizar el biofilm formado, las células fueron removidas y el pozo se lavó al chorro del agua y posteriormente, las células adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% durante 20 minutos. El colorante se remueve y se enjuagan las células adheridas al chorro del agua y finalmente con agua destilada. Para las determinaciones de formación de biofilm anaeróbicas, las placas de PVC o los tubos de ensaye fueron incubados en jarras anaeróbicas empleando los sobres de anaerobiosis GasPak™.

2.8.3 Microscopía óptica

La morfología de las células sobreproductoras de c-di-GMP se analizó por microscopía óptica en un microscopio óptico Nikon E-600 dic montado con una cámara Hamamatsu orca II empleando el aumento 600X. Todas las imágenes se procesaron con los programas Wasabi 1.4.0.2 y Adobe Photoshop 7.0.

2.8.4 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las células fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 1% y observadas en un microscopio electrónico JEOL-1200EXII (JEOL, Tokio, Japón).

CAPÍTULO 3. Antecedentes del estudio del operón *yddV-dos* de *E. coli* y de las proteínas codificadas en estos genes.

El interés inicial en este proyecto por estudiar el operón *yddV-dos* de *E. coli*, surgió por la interesante homología que comparte la proteína Dos de *E. coli* con la proteína FixL de *Rhizobium meliloti*, una histidina cinasa que funciona como un sensor de oxígeno para regular la expresión de genes que participan en el proceso de fijación de nitrógeno (96). La proteína FixL contiene en su extremo amino un dominio PAS asociado a un grupo hemo, al igual que la proteína Dos. Las propiedades fisicoquímicas de unir reversiblemente oxígeno a través del grupo hemo contenido en el dominio PAS de la proteína Dos, sugirió que esta proteína podría funcionar como un sensor directo de oxígeno en *E. coli*, por lo que se le denominó Dos por las siglas en inglés de *direct oxygen sensor* (73). En ese momento, los dominios GGDEF y EAL no cobraban la importancia que ahora tienen y no fueron tomados en cuenta para la asignación de la función de la proteína Dos.

Supusimos que la proteína Dos, al funcionar como un sensor de oxígeno en la bacteria facultativa *E. coli*, podría participar en la transición del metabolismo aeróbico al metabolismo anaeróbico o viceversa en esta bacteria. Una primera aproximación para probar esta hipótesis fue investigar si la mutación del gen *dos* afectaba la expresión de genes propios de esta transición metabólica. La construcción de la mutante en el gen *dos* se abordará más adelante. Se escogieron los genes *lldP* (L-lactato permeasa) y *cydA* (subunidad 1 del citocromo *bd*) para analizar su expresión en el fondo genético $\Delta dos::kan$ a través de fusiones con el gen reportero *lacZ* (83).

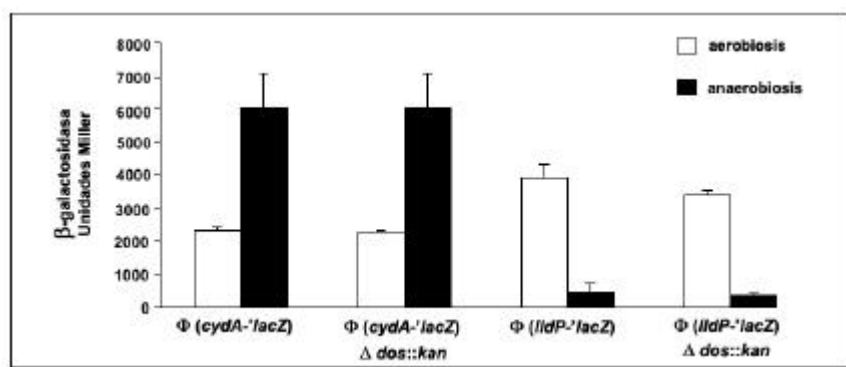


Figura 26. Expresión de las fusiones Φ (*cydA-lacZ*) y Φ (*lldP-lacZ*) en el fondo genético $\Delta dos::kan$ en crecimiento aeróbico (barras blancas) y anaeróbico (barras negras).

La mutación $\Delta dos::kan$ no modificó la expresión de las fusiones Φ (*cydA-lacZ*) y Φ (*lldP-lacZ*) (Fig. 26), por lo que concluimos que la proteína Dos no es un sensor de oxígeno importante en la transición de *E. coli* entre los metabolismos aeróbico y anaeróbico.

Al tiempo que se realizaban estos experimentos, los artículos que describían los dominios GGDEF y EAL y su distribución en bacterias comenzaban a surgir en la literatura (22,31). El grupo de Gilles-González reportó que la proteína Dos tenía homología a lo largo de toda la proteína con la proteína PdeA1 de *G. xylinus* (97). Previamente, otros reportes mostraban que las proteínas PdeA1 y Dgc1 de *G. xylinus* eran importantes en la síntesis y degradación del activador alostérico de la celulosa sintasa de esta bacteria (11,14,44,97).

Por lo anterior, y por lo ya descrito en el Capítulo 1, decidimos analizar las secuencias de las proteínas Dos y YddV de *E. coli*, encontrando que forman parte del grupo de proteínas con dominios GGDEF y EAL al igual que las proteínas PdeA1 y Dgc1 de *G. xylinus* (Fig. 27).

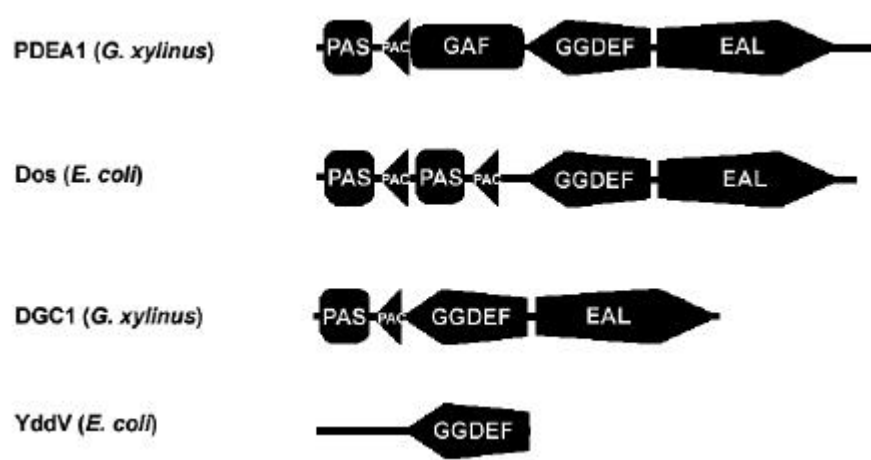


Figura 27. Esquema de los dominios de las proteínas PdeA1 y Dgc1 de *G. xylinus* y las proteínas Dos y YddV de *E. coli* (Fuente Swiss-Prot Database, <http://ca.expasy.org>).

- El dominio GGDEF de YddV tiene 32% de identidad con el dominio GGDEF de Dgc1, 31% de identidad con el de PdeA1 y 26% con el de Dos (Tabla 12).
- El dominio GGDEF de Dos tiene 23% de identidad con el dominio GGDEF de Dgc1 y 31% de identidad con el de PdeA1 (Tabla 12).
- El dominio EAL de Dos tiene 25% de identidad con el dominio EAL de Dgc1 y 48% de identidad con el dominio EAL de PdeA1 (Tabla 12).

El dominio GGDEF de YddV tiene mayor similitud con el de Dgc1 y los dominios GGDEF y EAL de Dos tienen mayor similitud con los de PdeA1 que con los de Dgc1 (Tabla 12). Estos datos nos permiten sugerir que YddV y Dos podrían tener actividades similares a las de Dgc1 y PdeA1 y podrían entonces, participar en la síntesis y degradación de c-di-GMP, respectivamente, en *E. coli*. A partir de lo descrito en este capítulo y en la literatura, este trabajo se enfocó en tratar de contribuir en el conocimiento del metabolismo de c-di-GMP en *E. coli* a través del estudio del operón *yddV-dos*.

Dominio GGDEF de YddV	TPLSVLIIDVDKFKEINDTWGHNTGDEILRKVSQAFYDNVRSSDYVFR YGGDEFIIVL TEASENETLR TAERIRSRVEKTKLKAANGEDIALSLSI GAAMFNHGP DYERLIQI ADEALYIAKRGRNRVELWKA
Dominio GGDEF de Dos	VSPVVYLIGVDHIQDVIDSLGYAWADQALLEVVNRFREKLKPDQYLCR IEGTQFVLVSL ENDVSNITQI ADEL RNVVSKPIMIDDKPFPLTLSIGI SYDLGKNRDYLLSTAHNAMDYIRKNGGNGWQFFSP
Dominio EAL de Dos	RLVLGAALKEAISNNQLKLVYQPQIFAETGELYGIEALARWHDP L HGH VPPSRFIPLAEEIGE IENIGRWVIAEACRQLAEWRSQNIHIPALSVNL SALHFRSNQLPNQVSDAMHAWGIDGHQLTVEITESMMEHDTEIFKRI QILRDMGVGLSVDDFGTGFSGLSRLVSLPVTEIKIDKSFVDRCLTEKR ILALLEAITSIGQSLNLT VVAEGVETKEQFEMLRKI HCRVIQGYFFSR PLPAEEIPGWMSSVL
Dominio GGDEF de Dgc1	LMNTRDLKSLAATDPLTGLFNRRGGFNMLQAAVEDKSNITRDIMLV MFDLDGFKQINDIHGHHAGDVVLKVISNRLLALVHPEDAVCRLGGDEF ALILNHTLHKYPLSLMLEKLLAELEAPIEVGNTMVNVSGSIGVSPIAS QESAESLQKNADIALYAAKRAGGHQARMF
Dominio EAL de Dgc1	ERAQILNDAREGVQKQDFELYQPIMNFSTGRCDQIEALVRWHHPQRG LLAAESFRDVF LDAALAQVMS PRLVKS FQNDMRMWN TSLDTPNLTIN LSRLDLLNIGFQNDLEAEIKRQGGKASDYVLEVSESVLAGRRSDRVLQ RLQDSKELGFQLTLD DFGLATLPISVLR TISFTQAKISRGLVKDIETS QQACDVVAHLIGLAHAFGLSVTVSGVETKAQMDALREMGADRIQGYI SPPISAN
Dominio GGDEF de PdeA1	QHATKTHLTQLARYDSL TGLLN R GALHRVMEDIAAQGNRTLAIFMLD IDRF RDINDALGHVYADQFLVEIAGRIRSIKDDYVLSRSGGDEFV VV VPDCEGKQIEEIAHKLLETIGRPLQIGQNTLSISCSIGISTFPANGPD SESLSHADTAMRQAKEDGRGIFRFA
Dominio EAL de PdeA1	DRLVLGSALRDSL AQGMLQLHYQPQVRTH TLELSGVEALS RWHHPHLG NIFPSRFIAVAEETGQIEAIGRWSLLEACRQIVKWDRDGIHVPTVAVN LSAVHFRNRALPEHIAALLKDHNLKPSRLTVEITESVMMDNSRDTEEV LQSIRNIGCGLSMDDFGTGYSSLSRLTRLP L TEIKIDRSFINDFEYDT NAQAVTMAVIGIGSRLGMTVVTEGVETEQQRD LLEKLNCDVMQGYLFA KPLAPQD

Tabla 12. Secuencias de los dominios GGDEF y EAL de las proteínas YddV y Dos de *E. coli* y Dgc1 y PdeA1 de *G. xylinus*.

CAPÍTULO 4. Regulación transcripcional de los genes *yddV* y *dos* de *E. coli*.

4.1 Antecedentes

Al momento no se conoce el papel fisiológico de los genes *yddV* y *dos* ni de las proteínas que codifican. Para abordar el estudio de estos genes analizamos la actividad transcripcional de estos genes para saber en qué etapa del crecimiento de *E. coli* es requerida su expresión y cómo es regulada.

4.2 Estrategia

El arreglo de los genes *yddV* y *dos* en el genoma de *E. coli* sugiere que se trata de un operón. Se sugirió un análisis por RT-PCR para determinar si se trata de un operón o de unidades transcripcionales independientes. Por otro lado se determinó el inicio de la transcripción mediante un experimento de 5'-RACE y, además, se llevó a cabo la construcción de fusiones transcripcionales de ambos genes con el gen reportero *lacZ* para analizar su actividad transcripcional en distintas condiciones de crecimiento.

4.3 RT-PCR del operón *yddV-dos*

Para analizar si los genes *yddV* y *dos* forman un operón o no, realizamos un análisis de RT-PCR empleando RNA total de la cepa MC4100 (silvestre) y la cepa JMH0478 (MC4100 pero $\Delta dos::kan$) purificado con el kit RNeasy de QIagen. Para eliminar el DNA contaminante que pudiera dar falsos positivos en las reacciones de PCR, al RNA purificado se le agregó la enzima *Sau3AI* durante 1 hora a 37°C y posteriormente se volvió a purificar para eliminar la enzima. Sintetizamos el cDNA como se describe en el capítulo 2 con el kit Omniscript de QIagen. Los oligonucleótidos empleados para la síntesis de cDNA son MM1 y MM3 (Fig. 28). Estos oligonucleótidos alinean en las siguientes zonas del operón:

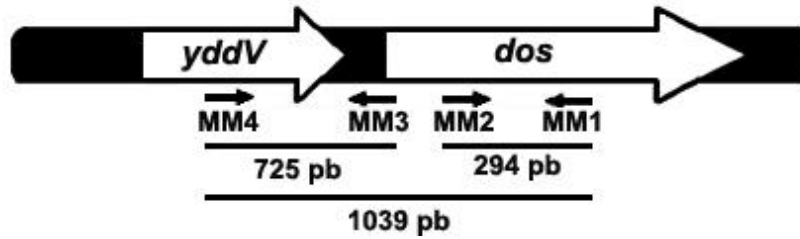


Figura 28. Zonas donde alinean los oligonucleótidos empleados en el experimento de RT-PCR.

Posteriormente, de cada cDNA sintetizado se llevaron a cabo reacciones de PCR con los oligonucleótidos MM1 + MM2, MM3 + MM4 y MM1 + MM4, que amplifican fragmentos de 294, 725 y 1039 pb, respectivamente. Para verificar que los oligonucleótidos fueron diseñados correctamente, se realizaron reacciones de PCR a partir de DNA cromosomal de la cepa MC4100. Los productos se analizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Fig. 29).

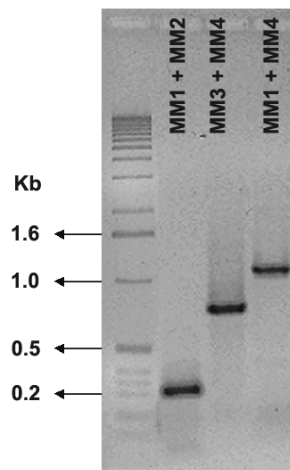


Figura 29. Productos de PCR obtenidos a partir de DNA cromosomal de la cepa MC4100, empleando los oligonucleótidos MM1 + MM2, MM3 + MM4 y MM1 + MM4.

Estas mismas reacciones se llevaron a cabo con los cDNAs sintetizados a partir de RNA de la cepa MC4100 (silvestre) y JMH0478 ($\Delta dos::kan$). Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. El gel obtenido es el siguiente (Fig. 30):

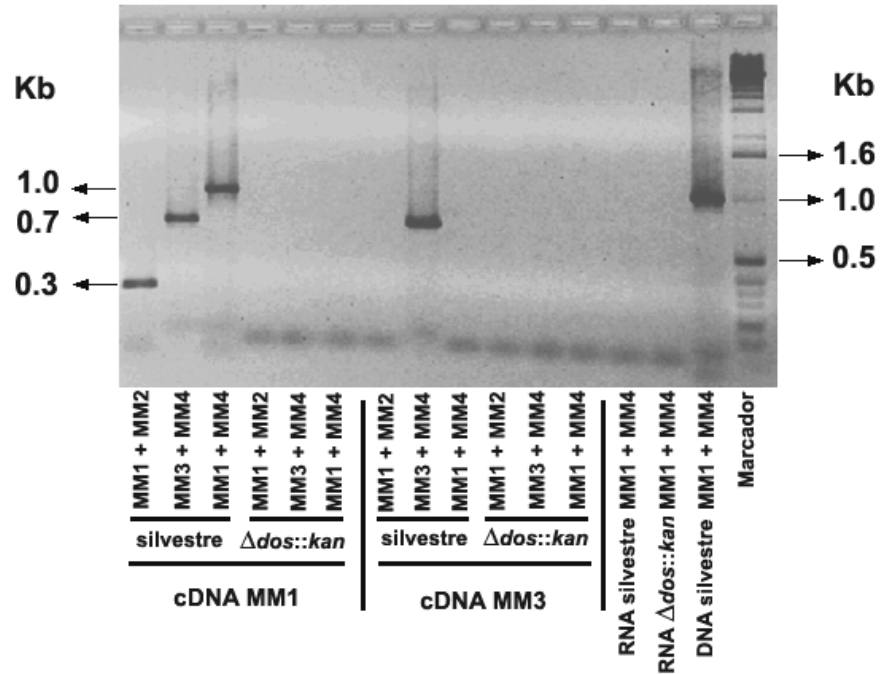


Figura 30. Productos de PCR a partir de cDNA sintetizado de las cepas MC4100 y JMH0478.

Los tres productos de PCR a partir del cDNA sintetizado con el oligonucleótido MM1 se obtuvieron únicamente en la cepa silvestre y ninguno en la mutante. Al no estar presente el gen *dos* en la cepa mutante $\Delta dos::kan$, no hay posibilidad de que el oligonucleótido MM1 pueda alinearse y por tanto no se obtiene cDNA; sin embargo, para el caso de la cepa silvestre, se obtuvieron los tres fragmentos de PCR, tanto de la región de *dos* como de *yddV*. Esto significa que en el cDNA sintetizado con el oligonucleótido MM1 contiene ambos genes, demostrando que *yddV* y *dos* se encuentran en una sola unidad transcripcional y por lo tanto forman un operón.

Por otro lado, el único producto de PCR obtenido a partir del cDNA sintetizado con el oligonucleótido MM3 fue el fragmento de 725pb que se amplifica con los oligonucleótidos MM3 y MM4. Este resultado es esperado pues el cDNA sintetizado con el oligonucleótido MM3 únicamente incluye al gen *yddV*.

Este resultado demuestra que los genes *yddV* y *dos* forman un bicistrón; sin embargo, no se excluye la posibilidad de que el gen *dos* se pueda transcribir como una unidad transcripcional independiente de *yddV*.

4.4 Expresión del operón *yddV-dos*.

4.4.1 Expresión de las fusiones $\Phi(dos-'lacZ)$, $\Phi(yddV-'lacZ)_C$ y $\Phi(yddV-'lacZ)_L$ en condiciones de crecimiento aeróbicas y anaeróbicas.

Analizamos la expresión de las tres fusiones que construimos, $\Phi(dos-'lacZ)$, $\Phi(yddV-'lacZ)_C$ y $\Phi(yddV-'lacZ)_L$ (ver sección 2.6.12 de materiales y métodos), en distintas condiciones de crecimiento para saber en cuál etapa del crecimiento bacteriano se requiere la expresión de los genes *yddV* y *dos*. Primero analizamos la expresión de las fusiones en crecimiento aeróbico (Fig. 31), en medio LB con agitación, tanto en fase exponencial, cuando los cultivos alcanzaron aproximadamente una $DO_{600nm} = 0.5$, como en fase estacionaria, cuando los cultivos alcanzaron una densidad aproximada a $DO_{600nm} = 2.0$.

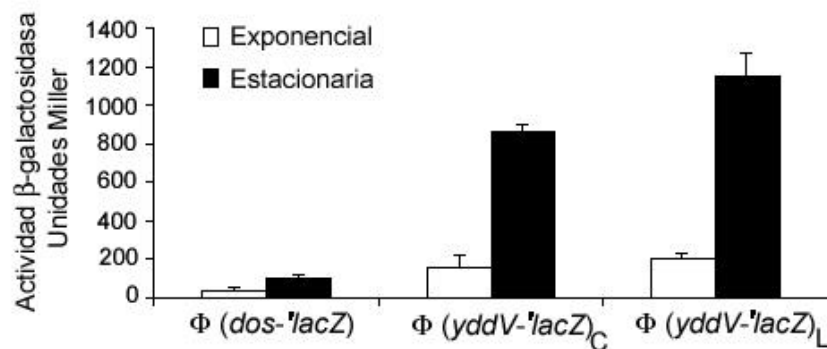


Figura 31. Expresión de las fusiones con el gen reportero *lacZ* en condiciones de crecimiento aeróbico, en fase exponencial y estacionaria.

En fase exponencial observamos una expresión basal baja en las tres fusiones, la cual aumenta alrededor de 4 veces en fase estacionaria para el caso de las fusiones $\Phi(yddV-'lacZ)$ corta y larga; sin embargo, en el caso de la fusión $\Phi(dos-'lacZ)$ no observamos este incremento (Fig. 31).

Por otro lado medimos la expresión de las tres fusiones en condiciones de crecimiento anaeróbico en medio LB + Glu 0.2%. La densidad celular en fase exponencial anaeróbicamente fue aproximadamente de $DO_{600nm} = 0.4$ y en fase estacionaria de $DO_{600nm} = 1.2$ (Fig. 32).

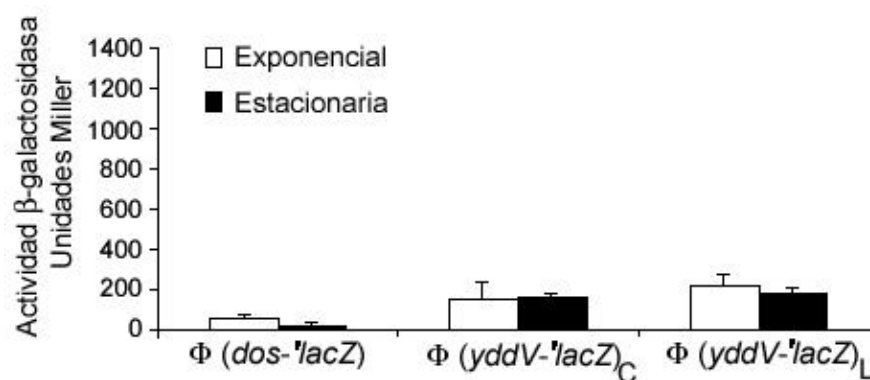


Figura 32. Expresión de las fusiones con el gen reportero *lacZ* en condiciones de crecimiento anaeróbico, en fase exponencial y estacionaria.

El aumento de la expresión observada en aerobiosis no se observó en crecimiento anaeróbico para ninguna de las tres fusiones, lo que nos permite concluir que el operón *yddV-dos* se expresa principalmente en fase estacionaria y en aerobiosis. La baja expresión observada en la fusión $\Phi(dos-lacZ)$ en todas las condiciones estudiadas, apoya el dato observado por RT-PCR que sugiere que el gen *dos* no es una unidad transcripcional independiente y, por tanto, su expresión depende del promotor de *yddV*, tratándose entonces de genes organizados en operón.

En cuanto a la expresión de las fusiones $\Phi(yddV-lacZ)$ corta y larga, observamos que los niveles de expresión alcanzados por ambas fusiones no tienen diferencias significativas, lo que significa que la región promotora de la fusión larga, que incluye una parte estructural del gen *yddW* adicional a la región de la fusión corta, no contiene elementos reguladores para la expresión de *yddV*, por lo que solamente decidimos trabajar con la fusión corta, a la que en adelante sólo llamaremos fusión $\Phi(yddV-lacZ)$.

4.4.3 Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento.

Analizamos la expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento en medio LB, aeróbicamente; que representa las condiciones de crecimiento donde se expresa la fusión (Fig. 33).

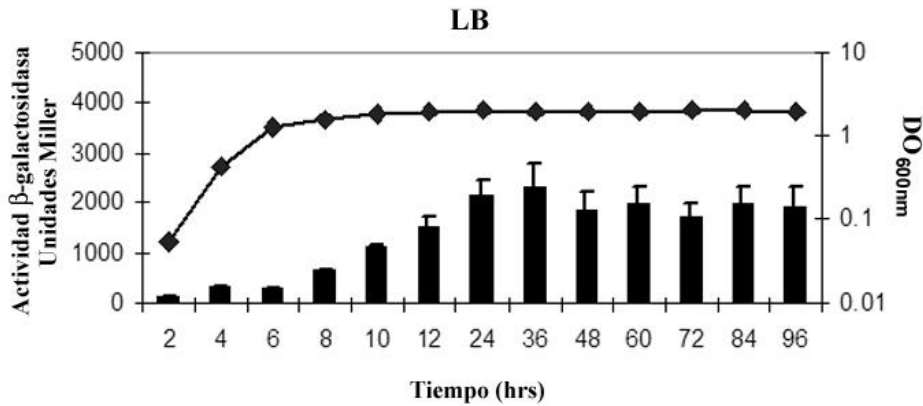


Figura 33. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento aeróbico en medio LB.

Observamos que efectivamente la inducción de la expresión ocurre principalmente en la fase estacionaria de crecimiento y se mantiene a lo largo de esta fase, por lo que la expresión del operón *yddV-dos* debe ser importante principalmente en aerobiosis y fase estacionaria (Fig. 33).

Por otro lado, analizamos si el medio de cultivo tiene algún efecto en la expresión del operón, así que medimos la actividad β-galactosidasa en cultivos crecidos en medio rico, empleando LB+Glucosa 0.2%, y en medio mínimo suplementado con glicerol al 0.2% como fuente de carbono y energía (ver materiales y métodos; Fig. 34). Encontramos que la expresión de la fusión sigue el mismo patrón de expresión a lo largo de la curva como en el experimento en LB (Fig. 34).

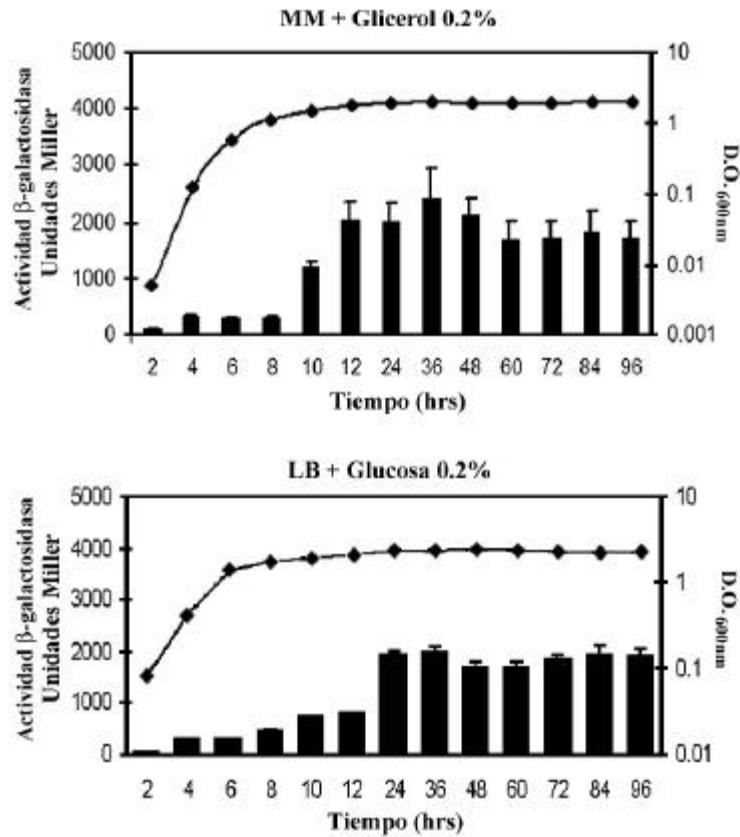


Figura 34. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ a lo largo de la curva de crecimiento aeróbico en medio mínimo + glicerol y medio LB más glucosa.

4.4.4 Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en los fondos genéticos *rpoS::tet*, *arcA::tet* y *fnr::Cm*

La expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en fase estacionaria sugiere que el factor RpoS; la subunidad σ^S de la RNA polimerasa que participa en la expresión de genes de fase estacionaria; podría participar en la regulación de la expresión del operón *yddV-dos*. Para probar si este factor σ tiene algún efecto en la regulación de la expresión del operón, transujimos mediante el fago P_{1vir} una mutación *rpoS::tet* a la cepa MC4100 que contiene la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ y medimos la actividad β -galactosidasa generada por la fusión en fase exponencial y estacionaria (Fig. 35):

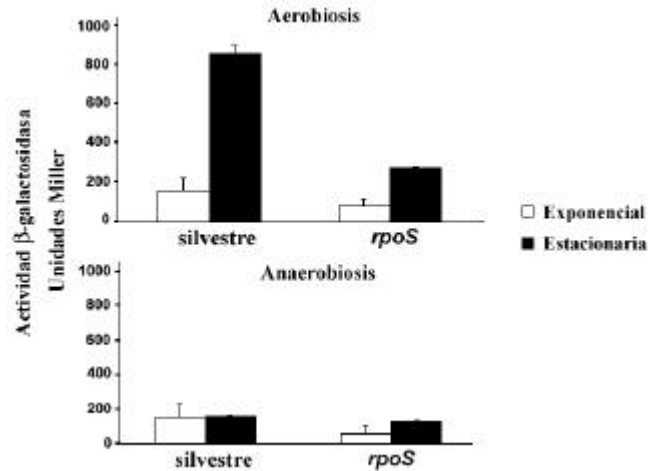


Figura 35. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético *rpoS::tet*.

La mutación *rpoS::tet* no tuvo efecto en la expresión en condiciones anaeróbicas; éste es un resultado esperado pues la expresión de la fusión prácticamente no se induce en anaerobiosis; sin embargo, en crecimiento aeróbico en fase estacionaria observamos que la mutación en *rpoS* provoca una disminución de la expresión de aproximadamente 4 veces comparando con la expresión en el fondo silvestre. Este resultado sugiere fuertemente que el factor RpoS participa en la regulación de la expresión del operón *yddV-dos*; sin embargo, a pesar de que en la mutante no se alcanzan los niveles de expresión en fase estacionaria observados en la cepa silvestre, en fase estacionaria todavía hay un aumento de la expresión independiente de RpoS, por lo que sugerimos que existe algún otro regulador transcripcional responsable de la expresión residual observada.

Por otro lado, analizando la secuencia de la región promotora del operón *yddV-dos* encontramos dos posibles secuencias de unión de los factores transcripcionales ArcA (regulador global de genes de metabolismo aeróbico) y de Fnr (regulador global de genes de metabolismo anaeróbico) (Fig. 36).

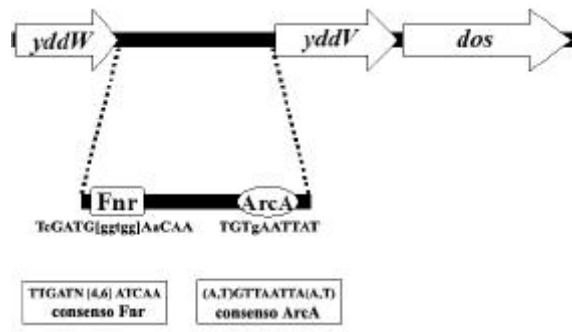


Figura 36. Secuencias de unión de los reguladores transcripcionales ArcA y Fnr en la región promotora del operón *yddV-dos*. Debajo de los posibles sitios de unión de los reguladores, se muestran en mayúsculas las bases conservadas de las secuencias consenso.

Para saber si estos genes participan en la regulación de la expresión del operón, analizamos la expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en cepas afectadas en los genes *arcA* y *fnr* que codifican para estos reguladores transcripcionales respectivamente. El sitio de reconocimiento de ArcA en el promotor del operón *yddV-dos*, sobrelapa con el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el resultado obtenido de la medición de la expresión en el fondo *arcA::tet* indica que la expresión aeróbicamente en fase estacionaria disminuye alrededor de un tercio de la expresión en la cepa silvestre (Fig.37) por lo que se sugiere que la proteína ArcA podría inducir parcialmente la expresión del operón en condiciones de crecimiento aeróbico en fase estacionaria.

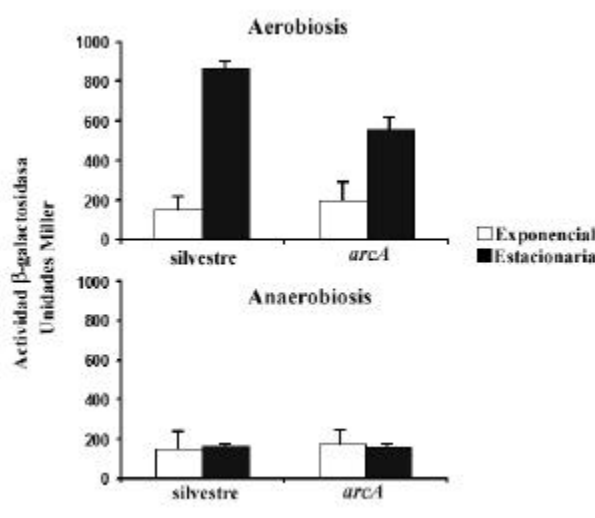


Figura 37. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético *arcA::tet*, en fase exponencial y estacionaria de crecimiento aeróbico y anaeróbico.

Por otro lado la mutación en el gen *fnr* no tuvo efecto en la expresión del operón en condiciones de crecimiento aeróbico ni anaeróbico en fase exponencial o estacionaria (Fig. 38).

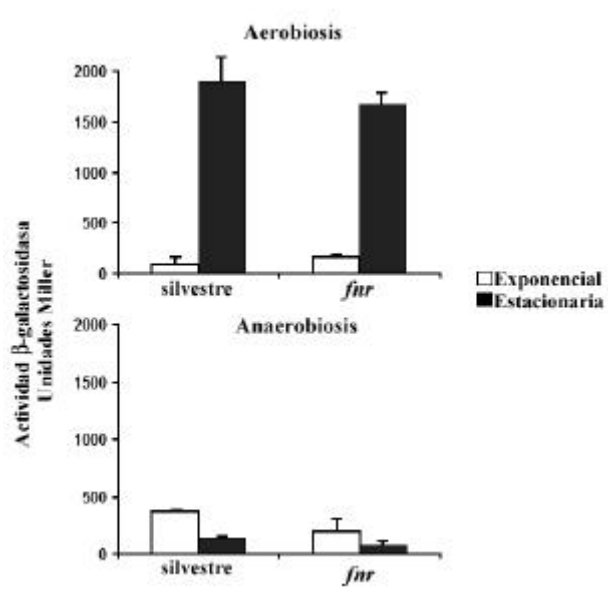


Figura 38. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en un fondo genético *fnr::Cm* en fase exponencial y estacionaria de crecimiento aeróbico y anaeróbico..

Finalmente en la búsqueda de alguna condición en la que la fusión se expresara además de la fase estacionaria aeróbica, analizamos la expresión de la fusión en condiciones de estrés oxidativo. Se realizaron ensayos de β -galactosidasa en células tratadas con agentes oxidantes como paraquat (generador cíclico de radicales superóxido), nitroprusiato de sodio (SNP; que produce oxidación por generación de especies reactivas de nitrógeno) y oxidación por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Al parecer ninguno de estos agentes produce inducción de la expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ (Fig. 39).

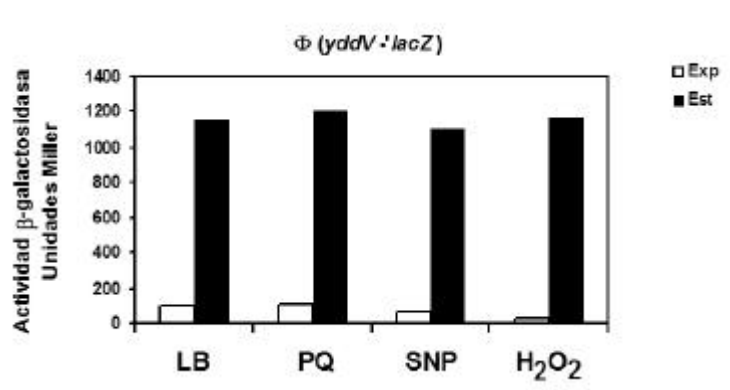


Figura 39. Expresión de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en condiciones de estrés oxidativo.

4.5 Determinación del inicio de la transcripción del operón *yddV-dos*

Se determinó el inicio de la transcripción del operón *yddV-dos* empleando el método de 5'-RACE de Invitrogen® (ver materiales y métodos). La estrategia general consistió en sintetizar cDNA a partir de RNA total, purificado de cultivos en fase exponencial y estacionaria, de la cepa MC4100 que tiene el plásmido $p\Phi(yddV-lacZ)_C$ crecida en medio LB. El cDNA se sintetizó con el kit Omniscript® de Qiagen® empleando el oligonucleótido reverso complementario *lacZrev* (ver materiales y métodos) que alinea a 58 pb del codón de inicio *atg* del gen *lacZ* de la fusión. Empleando este oligonucleótido, la síntesis de cDNA termina en el extremo 5' del mensajero de la fusión, es decir, en el inicio de la transcripción del operón *yddV-dos*. Al cDNA obtenido se adicionó una cadena de nucleótidos de guanina por la acción de la enzima transferasa terminal (TdT) en el extremo 5' y entonces el cDNA marcado con esta cadena de G's se amplificó por PCR en distintas rondas para posteriormente ser secuenciado e identificar el inicio de la transcripción del operón.

En la primera ronda de PCR (Tabla 13), se emplearon los oligonucleótidos *lacZrev* y AAP (incluido en el kit), que alinea en la cadena de G's, y Taq polimerasa de Invitrogen® bajo las siguientes condiciones:

94°C	1 min	1 ciclo
94°C	1 min	30 ciclos
57°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 13. Condiciones para las reacciones de PCR en el experimento de 5'-RACE.

En la segunda ronda de PCR bajo las mismas condiciones, se emplearon el oligonucleótido yh-PE que alinea dentro de la parte estructural del gen *yddV* contenida en la fusión $p\Phi(yddV-lacZ)_C$ (ver materiales y métodos) y el oligonucleótido AUAP (también incluido en el kit). En cada reacción se amplificó una banda de aproximadamente 250pb. Estas bandas fueron reamplificadas y purificadas para enviarlas a secuenciar. La secuencia de las bandas se obtuvo en el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, (Fig. 40).

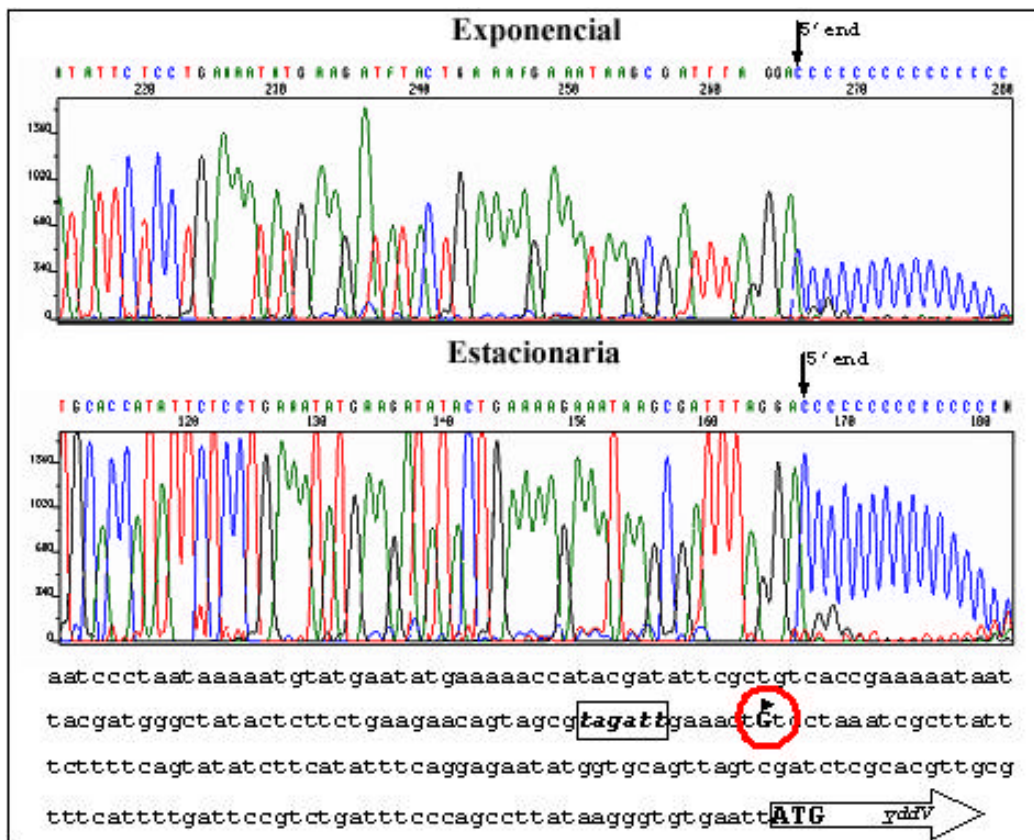


Figura 40. Identificación del sitio de inicio de la transcripción del operón *yddV-dos*.

Con esto identificamos que la transcripción, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria, inicia en una G que se encuentra 129 pb río arriba del ATG del gen *yddV*. Encontramos un solo inicio de la transcripción en ambas fases de crecimiento. Además, 6 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción se localiza una secuencia, TAGATT, que podría ser una posible caja -10 (caja Pribnow cuyo consenso es TATAAT); sin embargo, no encontramos la respectiva caja -35 (cuyo consenso es TTGACA). Por lo tanto, los genes *yddV* y *dos* forman un operón bicistrónico con un solo inicio de la transcripción.

4.6 Discusión

El análisis transcripcional de los genes *yddV* y *dos* muestra que son genes que se encuentran en un arreglo de operón bicistrónico y que el gen *dos* no se encuentra en una unidad transcripcional independiente, por lo que depende enteramente de la transcripción del bicistrón completo. Estos datos no descartan la posibilidad de que exista un mecanismo de regulación post-transcripcional para estos genes. El arreglo del bicistrón es interesante pues es un ejemplo en el que en un solo operón se encuentran codificadas dos proteínas de actividad antagónica que requieren de una transcripción concertada, lo que nos hace sugerir que el mecanismo fisiológico en que que potencialmente participan, requiere de una modulación de los niveles de c-di-GMP por acción de estas enzimas. Además de los genes *yddV-dos*, sólo los genes *yliE* y *yliF* que codifican para proteínas de membrana, una con dominio EAL y otra con dominio GGDEF, respectivamente, se encuentran contiguos en el genoma de *E. coli* y potencialmente podrían formar un operón.

El análisis de la expresión mediante fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* muestra que la expresión de estos genes ocurre en condiciones aeróbicas de crecimiento y en fase estacionaria principalmente. De acuerdo a los ensayos de β -galactosidasa en las mutantes *rpoS::tet*, el operón *yddV-dos* pertenece al regulón del factor sigma RpoS. El análisis del promotor de este operón muestra una posible caja -10 y la ausencia de una caja -35, secuencias de unión de la RNA polimerasa. La falta de una secuencia -35 es una característica de promotores reconocidos por σ^S (Tabla 14.)

Promotor	Secuencia	Referencia
Consenso σ^S	CTACACTN ₄₋₈ G/A	(98)
<i>dnaN</i>	GAAGATTN ₇ A	(99)
<i>himA</i>	GTAAACTN ₇ G	(100)
<i>yddV-dos</i>	GTAGATTN ₆ G	Este trabajo

Tabla 14. Alineamiento de secuencias -10 de operones regulados por σ^S (sigma 38).

De acuerdo a la Tabla 14, la caja -10 del operón *yddV-dos* tiene 4 bases conservadas, además de un inicio de la transcripción en G, consistente con el consenso reportado para el reconocimiento de RpoS; sin embargo, no se descarta la posibilidad que este promotor sea reconocido por el factor σ^{70} .

El requerimiento de condiciones aeróbicas para la expresión del operón *yddV-dos*, nos llevó a la medición de la expresión del operón en mutantes afectadas en los reguladores transcripcionales ArcA y Fnr, importantes en la regulación de genes de metabolismo aeróbico y anaeróbico respectivamente, además de que en la secuencia de la zona promotora del operón se encuentran dos posibles cajas de reconocimiento de los factores transcripcionales ArcA y Fnr. Los ensayos de β -galactosidasa de la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ en las mutantes *arcA::tet* y *fnr::Cm* mostró que ArcA podría participar como un regulador positivo del operón *yddV-dos* y el regulador Fnr no tienen un efecto en la transcripción del mismo.

4.7 Conclusiones

Respecto al análisis transcripcional de los genes *yddV* y *dos* podemos concluir lo siguiente:

- 1.- Los genes *yddV* y *dos* forman un operón bicistrónico.
- 2.- El inicio de la transcripción de este operón se encuentra a 129 pb río arriba del codón *atg* de inicio de la traducción del gen *yddV*.

3.- La expresión del operón se observó mediante el uso de fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ*, encontrando que el operón se expresa en fase estacionaria en condiciones de crecimiento aeróbico.

4.- La expresión del operón *yddV-dos* está regulada positivamente por el factor sigma RpoS.

5.- La expresión del operón *yddV-dos* no depende totalmente de RpoS pues en ausencia de este factor sigma, todavía se observa una expresión residual del operón que probablemente esté bajo la regulación de otro factor transcripcional adicional a RpoS.

CAPÍTULO 5 Efecto fisiológico de la mutagénesis del gen *dos* y del operón *yddV-dos*. Efecto en el perfil de expresión en crecimiento aeróbico y anaeróbico de *E. coli*

5.1 Antecedentes

Como se mencionó en los capítulos 2 y 3, la proteína Dos fue originalmente descrita como un sensor de oxígeno, homólogo a la proteína FixL de *R. meliloti*, por la similitud que ambas proteínas comparten en un dominio PAS asociado a un grupo hemo; además de los datos cinéticos que muestran que la proteína Dos puede unir reversiblemente oxígeno(73). A la fecha hay discrepancias sobre el sustrato que puede hidrolizar la proteína Dos. Los primeros resultados publicados por el grupo de T. Shimizu acerca de la actividad enzimática de Dos, muestran que la actividad de fosfodiesterasa de esta proteína es sobre cAMP y que esta actividad depende del estado redox del hierro del grupo hemo, siendo activa la proteína cuando el hierro se encuentra en su forma reducida (Fe^{2+}), mientras que en estado oxidado (Fe^{3+}) la proteína es inactiva (74). El mismo grupo de investigación reportó recientemente que la proteína Dos también tiene actividad de fosfodiesterasa de c-di-GMP aún cuando el hierro se encuentra en estado oxidado y que la proteína es más activa cuando el hierro se encuentra en estado reducido y más aún cuando el hierro tiene coordinado O_2 o CO (101). Por otro lado, el grupo de investigación de M. Gomelsky analizó la actividad enzimática de los dominios EAL de proteínas de distintas bacterias. En este estudio, uno de los dominios EAL analizados fue el de la proteína Dos y este trabajo concluye que su actividad es la de hidrolizar c-di-GMP a 5'pGpG y, bajo sus condiciones experimentales, no detectaron actividad de fosfodiesterasa sobre otros nucleótidos cíclicos incluyendo cAMP (69).

5.2 Estrategia

Para identificar el papel fisiológico que tienen las proteínas YddV y Dos en el metabolismo de *E. coli*, la primera estrategia para abordar este problema fue la de mutagenizar el gen *dos* y analizar el fenotipo resultante.

5.3 Mutación del gen *dos*

5.3.1 Construcción de una mutante $\Delta dos::kan$

Para la mutagénesis del gen *dos*, empleamos la técnica de reemplazamiento de genes por un casete de resistencia a un antibiótico mediante recombinación homóloga descrito en la sección 2.6.13, del capítulo de materiales y métodos. Se obtuvieron dos mutantes en la cepa JC7623 (mut1 y mut4). La mutación en estas dos cepas se corroboró primero por PCR (Fig. 43), amplificando la zona L-*dos*-R de la cepa JC7623 y L-*kan*-R de las mutantes 1 y 4, con los oligonucleótidos Dos-*Pst*I-L y Dos-*Eco*RI -R (ver materiales y métodos). Para la cepa JC7623 (wt) se amplifica con estos oligonucleótidos un fragmento de 4.5 kb y para las mutantes un fragmento de 3.3 kb. Como un control adicional, amplificamos el fragmento de 4.5 kb a partir de DNA de la cepa MC4100 (Fig. 41).

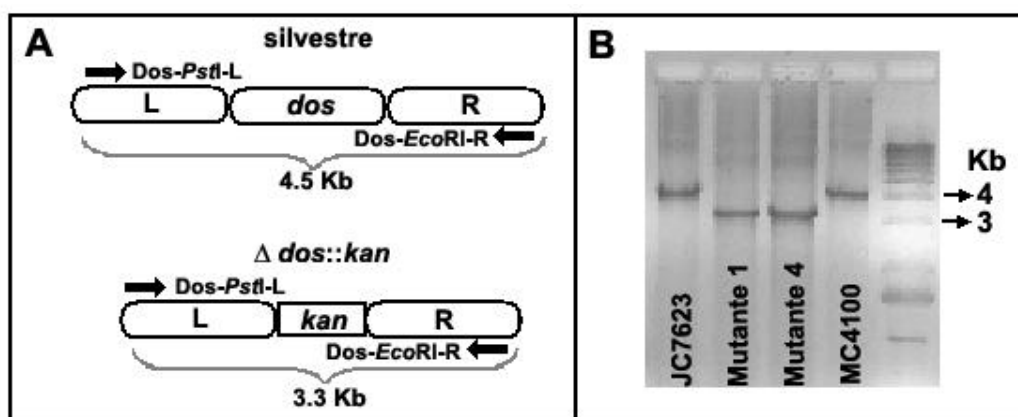


Figura 41. Caracterización molecular por PCR de las mutantes 1 y 4 ($\Delta dos::kan$) construidas en el fondo genético JC7623. A) Esquema de los fragmentos esperados en la amplificación empleando los oligonucleótidos Dos-*Pst*I-L y Dos-*Eco*RI -R en una cepa silvestre y en una mutante $\Delta dos::kan$. B) Gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio, mostrando los productos de PCR obtenidos a partir de DNA cromosomal de la cepa JC7623, las mutantes 1 y 4 y de la cepa silvestre MC4100.

Las mutantes 1 y 4 se caracterizaron también por Southern blot (ver materiales y métodos) para verificar la mutación. Se purificó DNA cromosomal de la cepa JC7623 y de las mutantes 1 y 4. Este DNA se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Empleando como sonda un fragmento de la región R, en la mutante JC7623 se observa un fragmento de aproximadamente 1.6 kb mientras que en las mutantes se observa un fragmento esperado de aprox. 1.3 kb (Fig. 42).

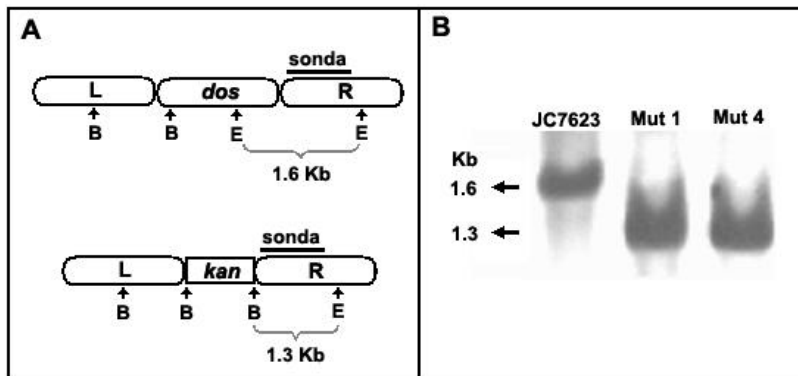


Figura 42. Southern blot de las mutantes $\Delta dos::kan$ en el fondo genético de la cepa JC7623. A) Diagrama de la región cromosomal L-*dos*-R y L-*kan*-R . Las flechas indican sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* (B) y *EcoRI* (E) de la cepa JC7623 y de las mutantes 1 y 4 $\Delta dos::kan$. La sonda empleada es representada como una barra negra sobre la región R, además del tamaño de los fragmentos esperados para cada caso. B) Autoradiografía del análisis de Southern blot de DNA cromosomal extraído de la cepa JC7623 y de las mutantes 1 y 4.

Se realizó otro experimento de Southern blot, empleando DNA de las cepas JC7623 y mutantes 1 y 4 pero empleando como sonda el casete de kanamicina (aproximadamente 1.3 kb) obtenido por la digestión con la enzima *BamHI* del plásmido pUC4K. Únicamente el DNA de las mutantes hibridó con esta sonda como se esperaba (Fig. 43).

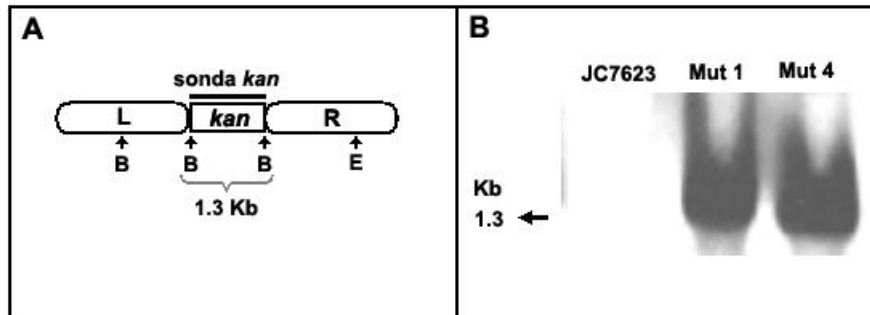


Figura 43. Southern blot de las mutantes $\Delta dos::kan$ en el fondo genético de la cepa JC7623 empleando como sonda el casete de resistencia a kanamicina. A) Diagrama de la región cromosomal L-kan-R . Las flechas indican sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI (B) y *Eco*RI (E) de las mutantes $\Delta dos::kan$. La sonda empleada es representada como una barra negra que comprende el casete de kanamicina obtenido por digestión con la enzima *Bam*HI del plásmido pUC4K, además del tamaño del fragmento esperado de 1.3 kb en las mutantes. B) Autoradiografía del análisis de Southern blot de DNA cromosomal extraído de la cepa JC7623 y de las mutantes 1 y 4 empleando la sonda de kanamicina.

Posteriormente la mutación $\Delta dos::kan$ se transdujo a la cepa MC4100 mediante el fago P_{1vir} (ver materiales y métodos) para el posterior análisis de estas mutantes. Obtuvimos 4 transductantes (a, b, c y d) que se verificaron por PCR (Fig. 44). Para el posterior análisis de la mutación $\Delta dos::kan$ adoptamos a una de estas transductantes, a la cual nos referiremos como mutante $\Delta dos::kan$.

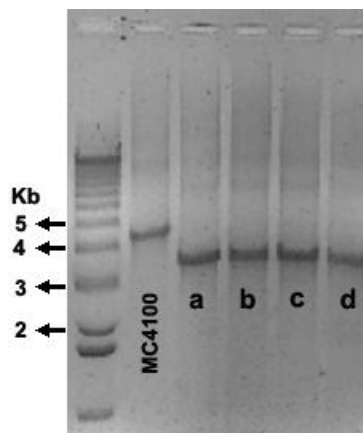


Figura 44. Caracterización molecular por PCR de las mutantes $\Delta dos::kan$ construidas por transducción mediante el fago P_{1vir} al fondo genético MC4100. El gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio muestra los fragmentos amplificados a partir

de DNA cromosomal de la cepa MC4100 y las transductantes a, b, c y d con los oligonucleótidos *Dos-PstI-L* y *Dos-EcoRI-R*. El peso esperado de los fragmentos para la cepa silvestre MC4100 y para las transductantes $\Delta dos::kan$ se muestra en la figura 41A).

5.3.2 Cinética de crecimiento de la mutante $\Delta dos::kan$.

El análisis fisiológico de la mutante $\Delta dos::kan$ se inició con el estudio de la cinética de crecimiento de la mutante comparada con la cepa silvestre MC4100. Las cinéticas de crecimiento se realizaron en medio rico (LB) y medio mínimo (MM). No observamos diferencias en el crecimiento de la mutante respecto a la cepa silvestre en crecimiento aeróbico (Fig. 45) y tampoco en crecimiento anaeróbico (Fig. 46).

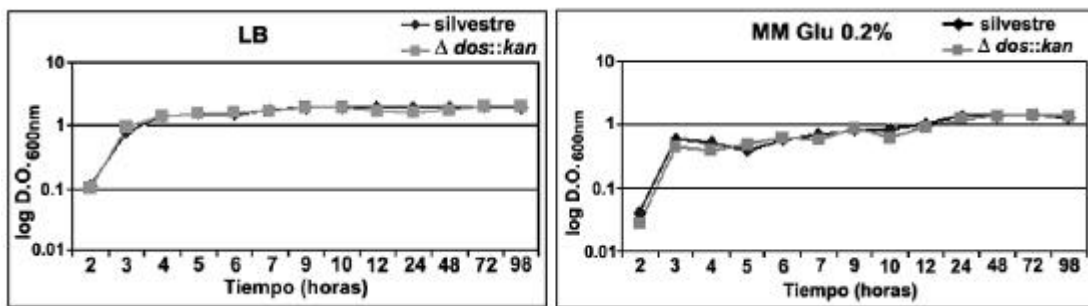


Figura 45. Cinética de crecimiento aeróbico de la mutante $\Delta dos::kan$ respecto a la cepa parental, silvestre MC4100 en medio LB y MM Glu 0.2%.

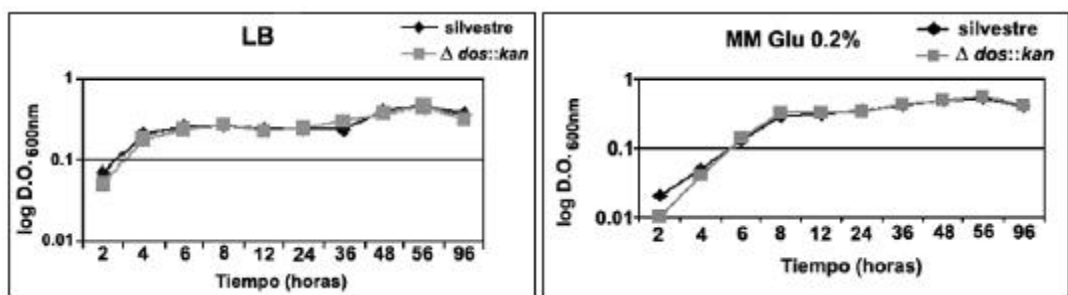


Figura 46. Cinética de crecimiento anaeróbico de la mutante $\Delta dos::kan$ respecto a la cepa parental, silvestre MC4100 en medio LB y MM Glu 0.2%.

5.3.3 Formación de biofilm de la cepa $\Delta dos::kan$

Dado que las proteínas con dominios GGDEF y EAL se han relacionado en la formación de biofilm (7), analizamos si la mutación $\Delta dos::kan$ tiene algún efecto en la formación de biofilm en *E. coli*. Para analizar esto, se transdujo la mutación $\Delta dos::kan$ a la cepa W3110, que es una cepa de laboratorio capaz de formar biofilm en pozos de PVC aeróbicamente (89). La transducción de la mutación al fondo genético W3110 se verificó por Southern blot (Fig. 47A) y el biofilm formado se analizó de acuerdo al protocolo de cristal violeta (ver materiales y métodos, Fig. 47B).

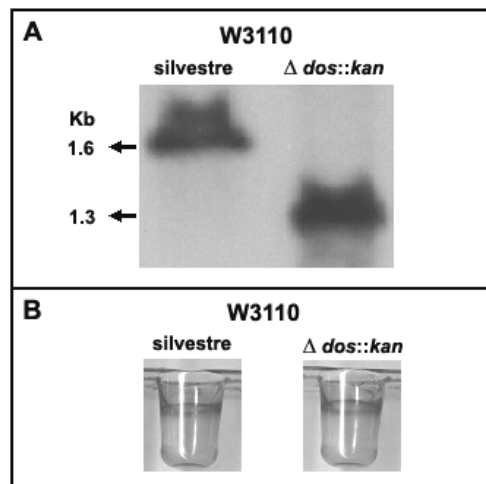


Figura 47. A) Southern blot de la transductante $\Delta dos::kan$ en el fondo genético de la cepa W3110. B) Formación de biofilm de las cepas W3110 silvestre y mutante $\Delta dos::kan$ en pozos de PVC. El biofilm formado es teñido con el colorante cristal violeta.

No encontramos diferencias significativas en la formación de biofilm de la mutante $\Delta dos::kan$ respecto al biofilm formado por la cepa silvestre W3110.

5.3.4 Síntesis de “curli” y celulosa en la cepa $\Delta dos::kan$

Otro de los fenotipos analizados en la mutante $\Delta dos::kan$ fue la producción de “curli” y celulosa empleando cajas de medio LB suplementado con rojo congo o calcoflúor (ver materiales y métodos). Como controles empleamos las cepas TOB1, Fec10 y Fec12 que

amablemente nos obsequió la Dra. Ute Romling del Instituto Karolinska en Suecia. Estas cepas son aislados fecales de *E. coli*, reportadas como cepas productoras de “curli” y celulosa. De acuerdo a los fenotipos reportados por el grupo de U. Romling (52), las colonias rojas en placas de LB suplementadas con rojo congo corresponden a células productoras de “curli” y celulosa, las color café son productoras sólo de “curli” y las color rosa son productoras únicamente de celulosa (Fig. 48A) y la producción de celulosa se hace evidente con la fluorescencia en calcoflúor (Fig. 48 B).

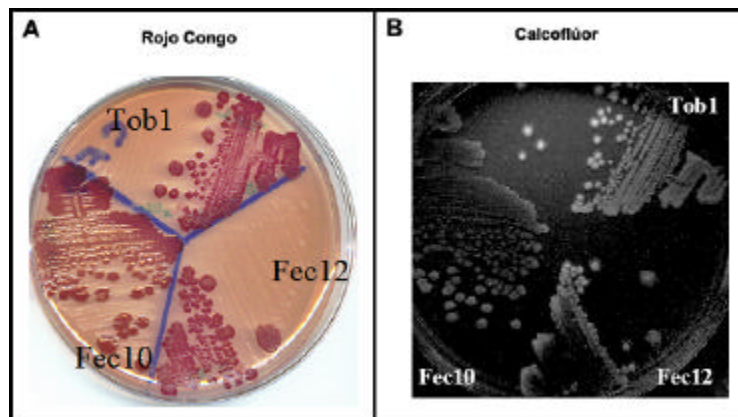


Figura 48. Fenotipos de las cepas de *E. coli*, TOB1, Fec 10 y Fec12, productoras de “curli” y celulosa en A) Placas de LB suplementadas con rojo congo y B) Placas de LB suplementadas con calcoflúor.

Analizamos el fenotipo de la mutante $\Delta dos::kan$ en placas con rojo congo en crecimiento aeróbico y anaeróbico. La cepa MC4100 silvestre y su respectiva mutante $\Delta dos::kan$ mostraron una café rojizo en crecimiento aeróbico pero no rojas como las cepas control (Fig. 49, A). En crecimiento anaeróbico esta coloración no fue evidente (Fig. 50,A). Para el caso de la cepa W3110 silvestre y su respectiva mutante $\Delta dos::kan$ la coloración observada en crecimiento aeróbico fue rosa (Fig. 49, B) pero en anaerobiosis fue blanca (Fig. 50, B). De acuerdo a lo anterior y a los fenotipos descritos en la literatura (52,102), la cepa MC4100 podría ser una cepa productora de “curli” pero no de celulosa, mientras que la cepa W3110 podría producir celulosa pero no “curli”. La mutación en el gen *dos* no afecta estos fenotipos, que dependen de la presencia de oxígeno.

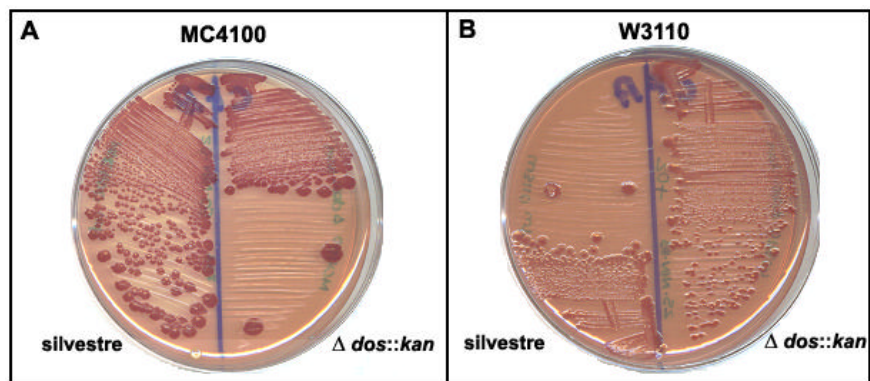


Figura 49. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, cultivadas en placas de LB suplementadas con rojo congo en crecimiento aeróbico.

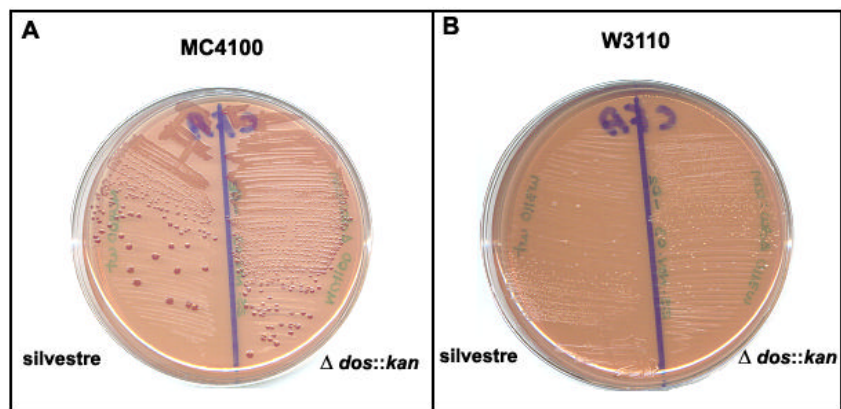


Figura 50. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, cultivadas en placas de LB suplementadas con rojo congo en crecimiento anaeróbico.

También analizamos el fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 y sus respectivas mutantes $\Delta dos::kan$ en placas de LB suplementadas con calcoflúor (Fig. 51). Encontramos que sólo la cepa W3110 (Fig. 51, A) fluoresce en este medio bajo luz UV de onda corta, mientras que la cepa MC4100 (Fig. 51, B) no fluoresce. De acuerdo a lo reportado (52), la fluorescencia indica producción de celulosa. La mutación en *dos* no afecta estos fenotipos. Este resultado junto con el de crecimiento en placas con rojo congo, muestra que la cepa MC4100 es productora sólo de “curli” y la cepa W3110 es productora sólo de celulosa, y que la mutación en el gen *dos* no afecta la producción de estos componentes extracelulares.

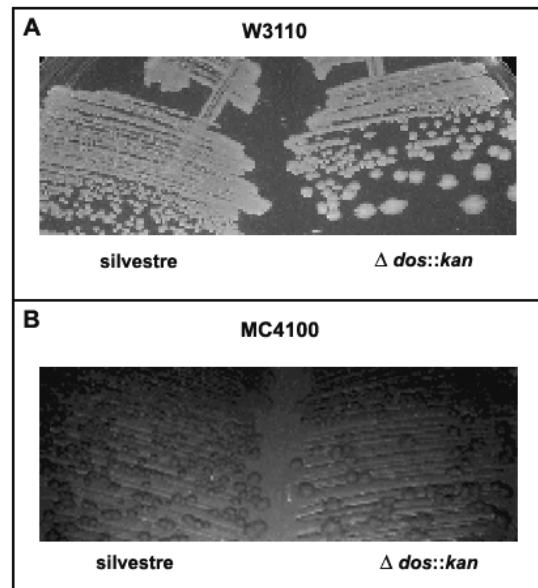


Figura 51. Fenotipo de las cepas MC4100 y W3110 silvestres y las respectivas mutantes $\Delta dos::kan$, cultivadas en placas de LB suplementadas con calcoflúor.

5.3.5 Microscopía óptica de la cepa $\Delta dos::kan$

Analizamos la cepa MC4100 y su respectiva mutante $\Delta dos::kan$, bajo el microscopio óptico con un aumento de 400X (Fig. 52).

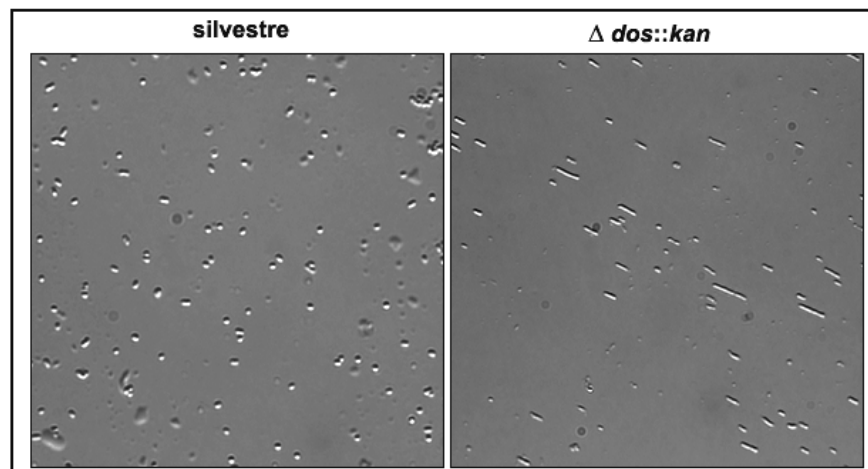


Figura 52. Microscopía óptica de células de la cepa MC4100 y de su respectiva mutante $\Delta dos::kan$ vistas bajo el microscopio óptico con un aumento de 400X.

Encontramos un ligero alargamiento de la mutante respecto a la cepa silvestre; sin embargo, la población de estas células alargadas era de aproximadamente el 25% de las células analizadas por lo que la mutación en el gen *dos* posiblemente esté afectando algún proceso en la división celular pero que probablemente las células pueden contender fácilmente con esta alteración. Un reporte reciente por el grupo de T. Shimizu en Japón mostró también este fenotipo en mutantes afectadas en el gen *dos* (103).

5.3.6 Viabilidad de la mutante $\Delta dos::kan$ respecto a la silvestre en estrés oxidativo

Determinamos la viabilidad de la cepa mutante $\Delta dos::kan$ en condiciones de crecimiento aeróbico sin tratar y tratadas con distintos agentes oxidantes como SNP (nitroprusiato de sodio, generador de especies reactivas de nitrógeno), PQ (paraquat, generador de superóxido) y H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) (Fig. 53). No encontramos diferencias significativas entre la cepa silvestre y su mutante $\Delta dos::kan$ en presencia de los agentes oxidantes.

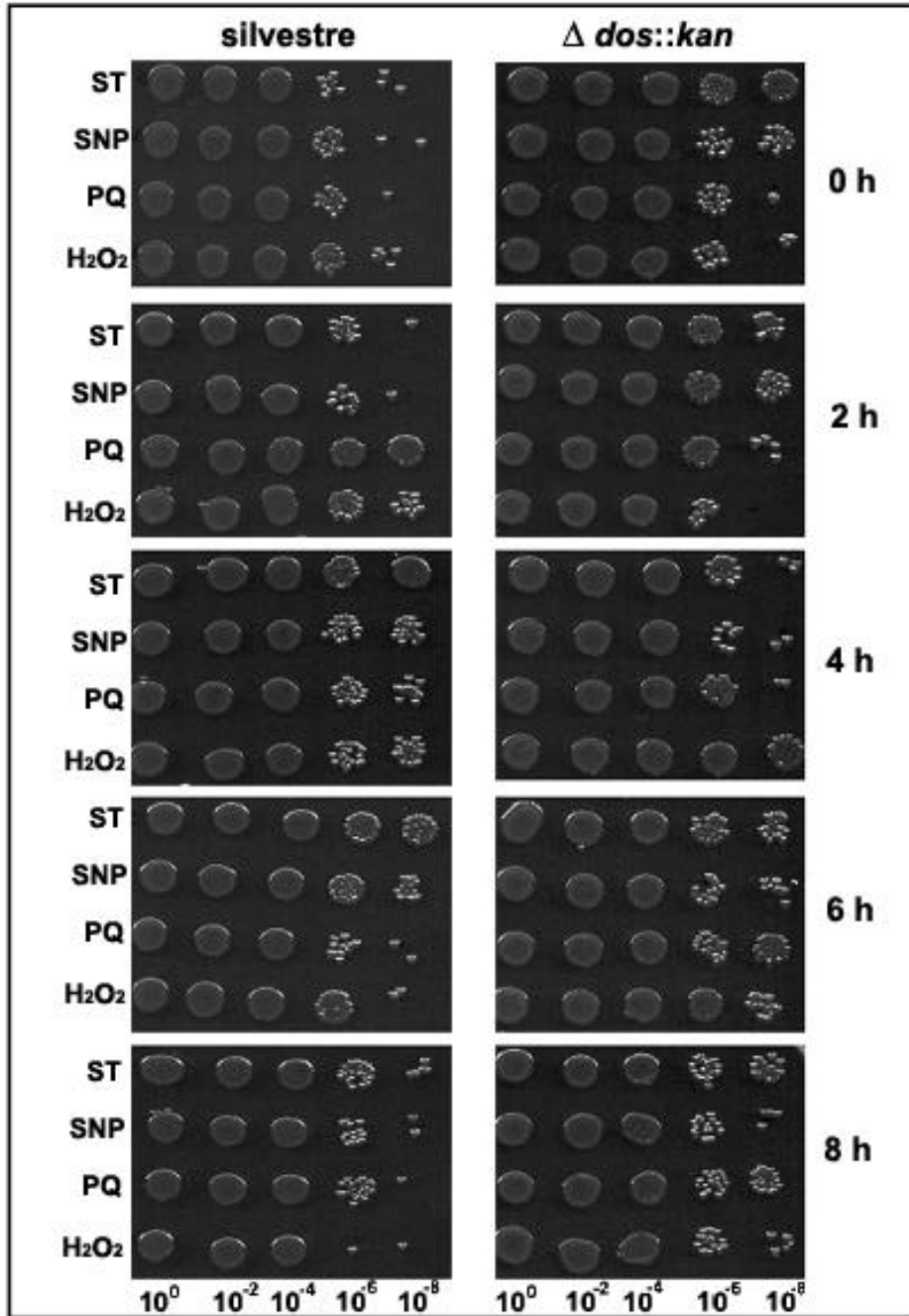


Figura 53. Viabilidad de las cepas MC4100 silvestre y $\Delta dos::kan$. Las células cultivadas en medio mínimo en fase exponencial fueron tratadas con los agentes oxidantes SNP (concentración final de 10mM), PQ (concentración final de 400 μ M), H₂O₂ (concentración final de 8mM) y sin tratar (ST). Posteriormente se hicieron diluciones 10⁰, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ y 10⁻⁸ de cada cultivo con MgSO₄ 10mM y se sembraron 10 μ l de cada dilución en cajas de LB para ver el crecimiento de las células viables.

5.4 Mutación del operón *yddV-dos*

5.4.1 Construcción de una mutante $\Delta yddV-dos::kan$

Para la mutagénesis del operón *yddV-dos*, empleamos el protocolo y los plásmidos proporcionados por el grupo de J.M Ghigo del Instituto Pasteur, en Francia (ver materiales y métodos). Es un método de inactivación de genes libre de clonación en el que se utiliza DNA lineal con regiones cortas de homología de aproximadamente 500 pb que flanquean un marcador de resistencia a antibiótico que se utiliza para transformar células competentes de *E. coli* que expresan las funciones λ red antes descritas.

El primer paso consistió en amplificar independientemente por PCR las regiones río arriba y río abajo del operón *yddV-dos* a partir de DNA cromosomal de la cepa MC4100, así como el casete de resistencia a kanamicina a partir de DNA cromosomal de la cepa JMH1232. Las regiones que flanquean los genes a mutar tienen homología con el casete de resistencia kanamicina, proporcionada por los oligonucleótidos con los que se amplifican estas regiones (oligonucleótidos YddV-GB-L3 y Dos-GB-L5, ver oligonucleótidos empleados en materiales y métodos). De tal forma que en un segundo paso, se amplifica en una reacción de PCR que contiene los tres fragmentos, un único producto de 1.2 kb que consiste en el casete de resistencia a kanamicina flanqueado por las regiones río abajo y río arriba de 500 pb adyacentes al operón (ver Fig. 21). El tercer paso consiste en transformar con este DNA lineal, células competentes que expresan las funciones λ -red, seleccionando colonias kanamicina resistentes, que son aquellas en las que se llevó a cabo el evento de recombinación en donde se sustituyó el operón *yddV-dos* por el casete Kan^r. Las mutantes obtenidas se verificaron por Southern blot (Fig. 54).

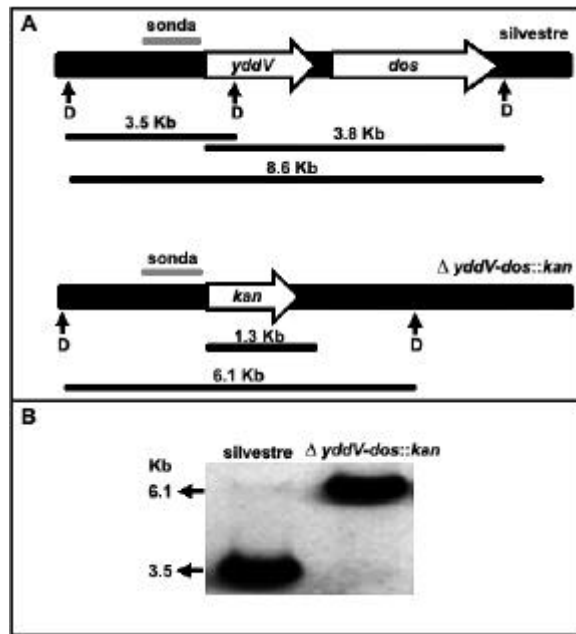


Figura 54. Análisis de Southern blot de las mutantes $\Delta yddV-dos::kan$ en el fondo genético de la cepa MG1655. A) Diagrama de la región cromosomal $yddV-dos$ y de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$. Las flechas indican sitios de corte de la enzimas de restricción *DraI* (D) de la cepa MG2655 silvestre y de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$. La sonda empleada es representada como una barra gris, además del tamaño de los fragmentos esperados para cada caso. B) Autoradiografía del análisis de Southern blot de DNA cromosomal extraído de la cepa MG2655 silvestre y de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$.

5.4.2 Cinética de crecimiento y fenotipos de la cepa $\Delta yddV-dos::kan$.

Para caracterizar esta mutante, analizamos la cinética de crecimiento en medio LB. La mutante en el operón tiene un ligero retardo en la velocidad de crecimiento en fase exponencial; sin embargo, en fase estacionaria tardía, alcanza la misma densidad óptica que la silvestre, por lo que el defecto en la velocidad de crecimiento causado por la mutación de la cepa mutante $\Delta yddV-dos::kan$ es superado en fase estacionaria (Fig. 55).

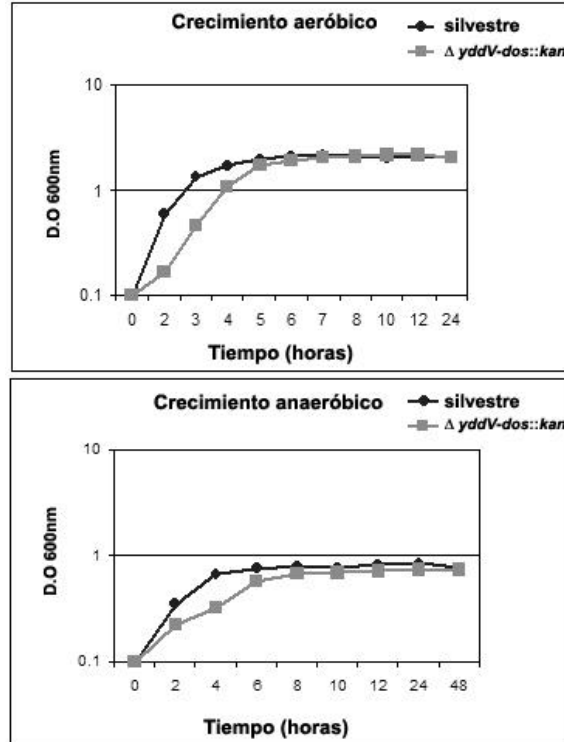


Figura 55. Cinética de crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, de las cepas MG1655 silvestre y MG1655 $\Delta yddV-dos::kan$.

La mutación en el operón *yddV-dos* no tuvo efecto en la producción de biofilm ni de “curli” o celulosa, por lo que el efecto de esta mutación no está relacionado con la síntesis de la matriz.

5.4.3 Microscopía óptica de la cepa $\Delta yddV-dos::kan$

Analizamos las mutantes al microscopio óptico y encontramos que las células se observan ligeramente más alargadas que la cepa silvestre. Probablemente hay un defecto en la división celular debida a la mutación $\Delta yddV-dos::kan$ que probablemente explica el retardo en el crecimiento en fase exponencial observado en las curvas de crecimiento de estas mutantes (Fig. 56).

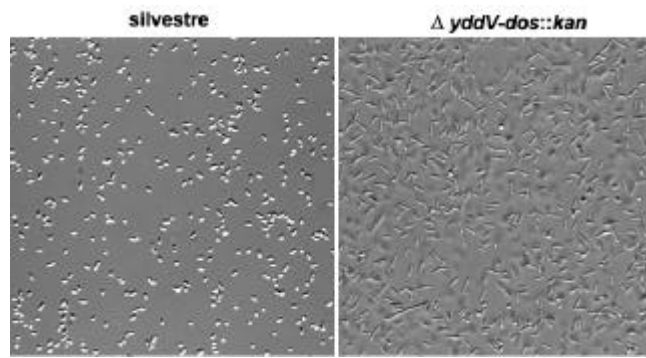


Figura 56. Microscopía óptica de la cepa MG1655 y su respectiva mutante $\Delta yddV-dos::kan$ vistas con aumento 400X.

5.4.5 Efecto de la mutación $\Delta yddV-dos::kan$ en el perfil transcripcional global de *E. coli* en crecimiento aeróbico

Para continuar la búsqueda del efecto de la mutación en el operón *yddV-dos*, nos apoyamos en la técnica de microarreglos para analizar el perfil transcripcional de la mutante MG1655 $\Delta yddV-dos::kan$ respecto a la silvestre. Para este análisis, purificamos RNA total de ambas cepas mediante el método de fenol caliente (ver materiales y métodos), a partir de células cultivadas en medio LB, aeróbicamente y cosechadas en fase exponencial, a D.O._{600nm} aproximadamente de 0.5-0.6. El RNA obtenido fue enviado a la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Únicamente se tomaron en cuenta los genes que modificaron su expresión 2 desviaciones estándar (2 DS) por arriba (genes inducidos) o debajo (genes reprimidos) de la media de expresión. Los genes fueron clasificados por su categoría funcional para ser analizados (Fig. 57).

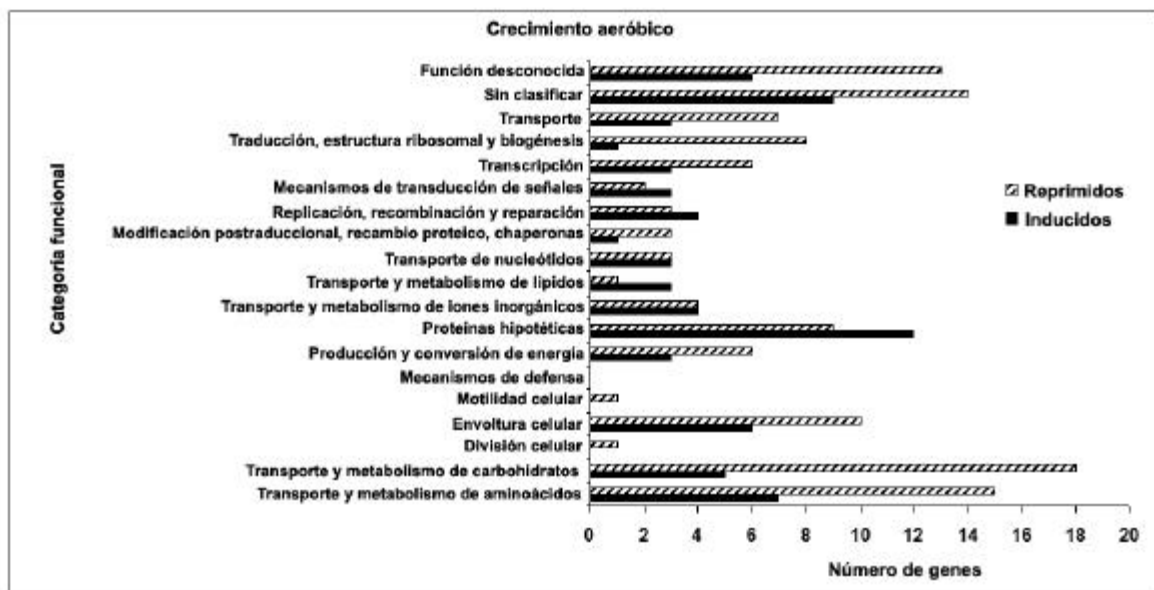


Figura 57. Genes inducidos y reprimidos en la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ cultivada en condiciones de crecimiento aeróbicas en fase exponencial.

Bajo estas condiciones de crecimiento, de los 4288 genes analizados, encontramos que 198 genes modificaron su expresión en ± 2 DS. De estos genes, 73 genes fueron inducidos y 125 genes fueron reprimidos en su expresión. La mayoría de los genes que modificaron su expresión cayeron en la categoría de genes que codifican para proteínas de función desconocida; sin embargo, se identificaron varios genes que participan en el transporte de carbohidratos y aminoácidos. La lista de los genes inducidos y reprimidos de este experimento se muestra en el material suplementario del artículo “Transcriptional regulation and mutagenesis analysis of the *yddV-dos* operon involved in the control of the intracellular levels of the second messenger c-di-GMP in *Escherichia coli* K-12. A genetic and genome-wide transcriptional profile analysis” (Anexo 2).

5.4.6 Efecto de la mutación $\Delta yddV-dos::kan$ en el perfil transcripcional global de *E. coli* en crecimiento anaeróbico

En un experimento paralelo, analizamos el perfil transcripcional de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ respecto a la cepa silvestre pero en condiciones de crecimiento anaeróbicas. Las células fueron cosechadas en fase exponencial ($D.O._{600nm} = 0.5 - 0.6$) a partir de cultivos

crecidos en jarras anaeróbicas para el aseguramiento de las condiciones de anaerobiosis. Bajo estas condiciones, encontramos que anaeróbicamente, 305 genes modifican su expresión en ± 2 DS. De estos 305 genes, 212 fueron inducidos en su expresión y 93 genes fueron reprimidos (Fig.58).

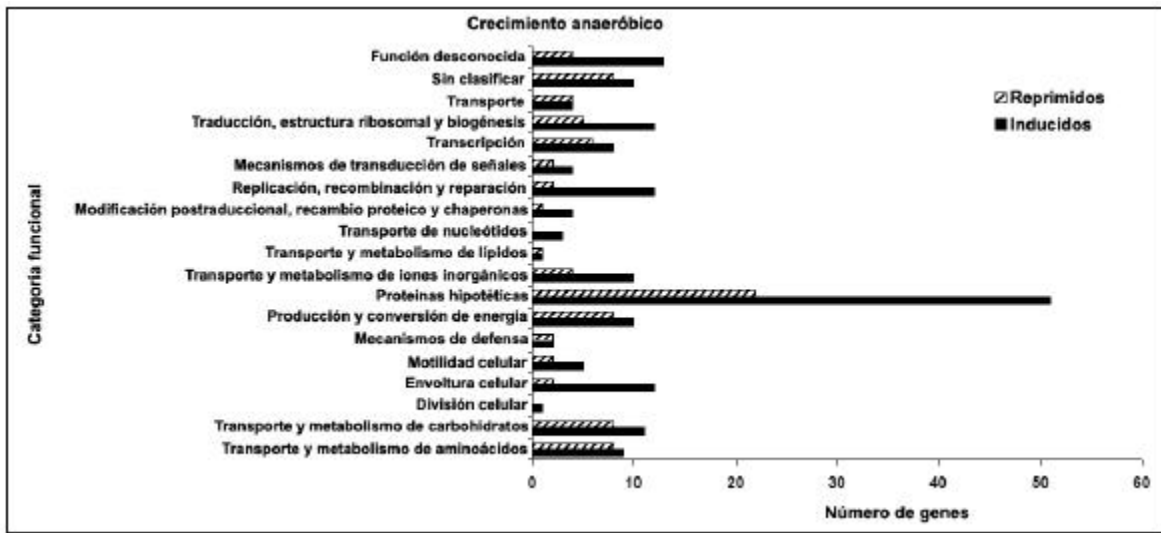


Figura 58. Genes inducidos y reprimidos en la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ cultivada en condiciones de crecimiento anaeróbicas en fase exponencial.

De los 4288 genes analizados, 212 genes fueron inducidos y 93 genes fueron reprimidos por la ausencia de los genes *yddV* y *dos*. Al igual que en el experimento aeróbico, la mayoría de los genes que modificaron su expresión por la falta del operón *yddV-dos* en crecimiento anaeróbico, pertenecen al grupo de genes que codifican para proteínas de función desconocida; sin embargo, un número considerable de genes pertenecientes a la envoltura celular se vieron modificados en su expresión tanto en crecimiento aeróbico como anaeróbico.

5.5 Discusión

Los genes *yddV* y *dos*, codifican para proteínas con dominios GGDEF y EAL involucrados en diversos procesos celulares como producción de componentes extracelulares, formación

de biofilm, diferenciación celular y en varias interacciones como célula-célula, célula-superficie y modulación de la superficie celular (7,45,104). Se esperaba que al mutar estos genes con la construcción de las mutantes $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$ se afectaría alguno de los procesos antes mencionados; sin embargo, no observamos un fenotipo claro para estas mutantes. La formación de biofilm, así como la producción de fimbria y celulosa no se modificó en las mutantes. Únicamente observamos un ligero efecto en la velocidad de crecimiento de la doble mutante $\Delta yddV-dos::kan$. Los microarreglos realizados para la doble mutante muestran que aeróbicamente varios genes que modifican su expresión caen en la categoría funcional de transporte y metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, por lo que probablemente la alteración de estos genes es la razón por la cual el crecimiento de la mutante se ve retardado.

Una modificación consistente en el fenotipo de ambas mutantes es el cambio en la morfología de las células, volviéndose alargadas en ambos casos. La mayoría de los genes que modifican su expresión en ambos microarreglos, son genes que codifican para proteínas de función no asignada o desconocida, por lo que no es claro el mecanismo por el cual la célula sufre estos cambios morfológicos.

5.6 Conclusiones

- 1.- Se obtuvieron las mutantes $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$ por sustitución de los genes por un casete de resistencia a kanamicina.
- 2.- La mutante $\Delta dos::kan$ no está afectada en el crecimiento ni en la viabilidad, pero la doble mutante $\Delta yddV-dos::kan$ tiene un ligero retardo en la velocidad de crecimiento en fase exponencial, el cual es superado en fase estacionaria.
- 3.- Las mutantes no modificaron la síntesis de componentes extracelulares como fimbria y celulosa y la cantidad de biofilm formado por estas mutantes no es diferente al producido por las respectivas cepas silvestres.
- 4.- El fenotipo más evidente fue un ligero alargamiento de las células en ambas cepas mutantes.

5.- De acuerdo a nuestros resultados, la mutación en el gen *dos* no afecta la poza de cAMP intracelular pues la actividad β -galactosidasa fue la misma en la cepa $\Delta dos::kan$ que en la silvestre.

6.- El análisis transcripcional global de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ en condiciones de crecimiento aeróbico muestra que la mayoría de los genes que modifican su expresión, codifican para proteínas de metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, pero la mayoría son de función desconocida, al igual que la mayoría de los genes que modificaron su expresión en condiciones de crecimiento anaeróbico.

CAPÍTULO 6 Estudio del efecto de altos niveles de c-di-GMP en la fisiología de *E. coli* y en su perfil transcripcional

6.1 Antecedentes

La sobreexpresión de proteínas con dominios GGDEF y EAL ha sido una estrategia para analizar el papel fisiológico de estos dominios en diversas bacterias (46,47,53). De esta manera se amplifican las consecuencias de la alteración de los niveles de c-di-GMP; sin embargo, esta estrategia experimental no está exenta de efectos secundarios no atribuibles a la alteración de los niveles de c-di-GMP. Por otro lado, la mutación de genes que codifican proteínas con dominios GGDEF y/o EAL probablemente puede ser fácilmente compensada por la función de alguna otra proteína que contenga estos dominios, debido a la reiteración de éstos en los genomas bacterianos (30,54). La mutagénesis de los genes *yddV* y *dos* no nos permitió observar un fenotipo claro que pudiera darnos alguna evidencia del papel fisiológico que juegan las proteínas YddV y Dos en el metabolismo de *E. coli*, por lo que decidimos emplear la estrategia de analizar el efecto de la sobreexpresión de una de estas proteínas.

6.2 Estrategia

La proteína YddV actúa como una diguanilato ciclasa (22,53). La clonación del gen *yddV* para sobreexpresar la diguanilato ciclasa nos permitiría causar un aumento de los niveles de c-di-GMP en la célula y así tratar de elucidar el efecto de las proteínas YddV y Dos como un sistema de regulación de las cantidades intracelulares de c-di-GMP. Por lo anterior, decidimos clonar el gen *yddV* en un vector inducible por IPTG y regular su expresión para analizar cómo repercute esta expresión en el metabolismo de *E. coli*.

6.3 Sobreexpresión del gen *yddV* por inducción con IPTG

Una vez clonado el gen *yddV* y verificado (ver sección 2.6.16), se procedió a transformar el plásmido pYddV a las cepas MC4100, MG1655, W3110 y TOB1 para su posterior análisis. Primero se analizó la sobreexpresión de la proteína YddV por inducción con IPTG de células con este plásmido, en cultivos aeróbicos en medio LB. Probamos dos concentraciones de IPTG, 0.3 mM y 1 mM. Encontramos que en las células que tienen el plásmido pYddV, después de una hora de ser tratadas con IPTG en ambas concentraciones, se sobreproduce una proteína de peso molecular entre 50 y 60 kDa (Fig. 59). El peso molecular calculado *in silico* de la proteína YddV es de 53 kDa, por lo que podemos concluir que logramos sobreexpresar la proteína YddV.

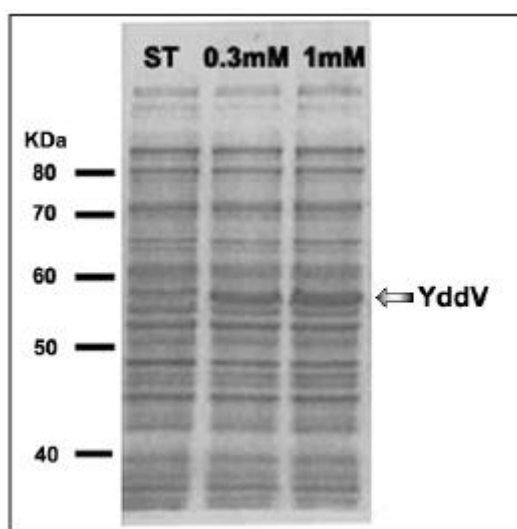


Figura 59. Sobreproducción de la proteína YddV por tratamiento de células que tienen el plásmido pYddV con IPTG a la concentración de 0.3 y 1 mM. Las células sin tratar (ST) no sobreexpresan la proteína en cantidades visibles en el gel.

6.4 Determinación de c-di-GMP en células sobreproductoras de YddV

Para saber si la proteína YddV sobreproducida funciona como diguanilato ciclasa, analizamos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) la producción de c-di-

GMP en extractos de células de la cepa MG1655 con el plásmido pYddV inducidas con IPTG 1 mM durante dos horas en cultivos en medio LB crecidos aeróbicamente. Como control empleamos células de la cepa MG1655 que tienen únicamente el vector pSE420 tratadas de la misma manera. La obtención de los extractos de ambas cepas, las condiciones empleadas en el HPLC y las columnas empleadas se describen en materiales y métodos.

Como muestra estándar empleamos c-di-GMP sintetizado químicamente en el laboratorio del Dr. Yoshihiro Hayakawa de la Universidad de Nagoya en Japón, disuelto en NaCl al 0.9%, a una concentración final de 1 mg/ml.

Analizamos la presencia de c-di-GMP en extractos de células sobreproductoras de YddV. En tres corridas inyectamos 10 µl del estándar de c-di-GMP (Fig. 60A), 20 µl del extracto que sobreproduce YddV (Fig. 60B) y finalmente una mezcla de 1µl de estándar más 60 µl de extracto (Fig. 60C).

El estándar de c-di-GMP fue detectado a los 8.7 minutos de tiempo de retención (Fig. 60A) y el pico obtenido en el cromatograma tiene un absorbancia a 252 nm, la longitud de onda a la que es detectado el c-di-GMP, de casi 1.2 unidades. En el extracto de células que sobreproducen YddV, aparece en el cromatograma un pico en 8.4 minutos con una absorbancia de 0.1 unidades (Fig. 60B). Aunque la absorbancia es baja, lo que indica una baja concentración de la especie detectada, el tiempo de retención es muy cercano al del c-di-GMP estándar. Para asegurarnos que este pico se trata de c-di-GMP, hicimos una mezcla de estándar más extracto y analizamos el cromatograma. En la región de interés, solamente obtuvimos una señal en 8.7 minutos de tiempo de retención, y un incremento de la absorbancia hasta 0.8 unidades, lo que nos permite concluir que la especie que apareció en 8.4 minutos en el cromatograma de la Fig. 60B, corresponde a c-di-GMP. En caso contrario, se habrían separado dos picos en esa región, uno en 8.4 min y de una absorbancia de aproximadamente 0.3 unidades debido a que inyectamos 3 veces más que en el cromatograma de la Fig. 60B y otro pico en 8.7 minutos de una absorbancia de 0.12 unidades aproximadamente, lo que corresponde a un décimo de lo inyectado en el cromatograma del estándar solo (Fig. 60A). La aparición de un solo pico y el incremento en

la absorbancia indica que el c-di-GMP presente en el extracto fue enriquecido con el c-di-GMP estándar adicionado en la mezcla. Con esto concluimos que la proteína YddV sobreexpresada por la inducción con IPTG de células que tienen el plásmido pYddV, funciona como diguanilato ciclasa, incrementando los niveles intracelulares de c-di-GMP.

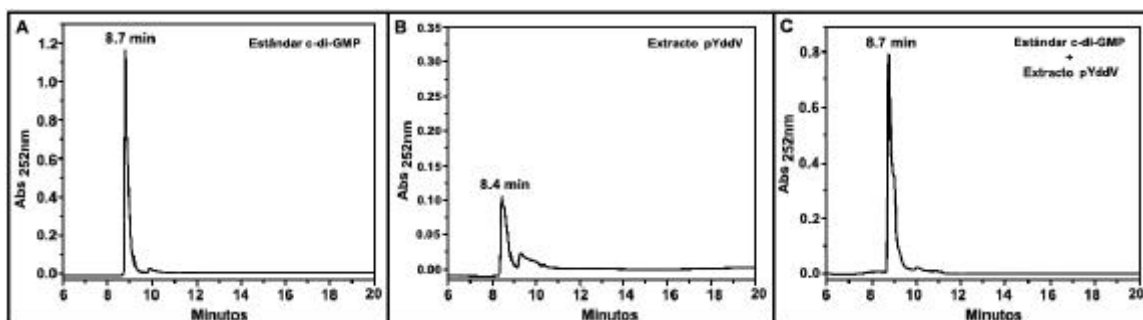


Figura 60. Análisis de la producción de c-di-GMP por HPLC. A) Inyección de 10 μ l de estándar de c-di-GMP, [1 mg/ml]. B) Inyección de 20 μ l del extracto celular que sobreproduce YddV. C) Inyección de una mezcla de 1 μ l del estándar más 60 μ l del extracto que sobreproduce YddV.

6.5 Acumulación de c-di-GMP por la sobreproducción de YddV

Una vez que determinamos la producción de c-di-GMP por YddV, realizamos una cinética de acumulación de c-di-GMP a distintos tiempos de tratamiento de las células de la cepa MG1655 con el plásmido pYddV con IPTG. Realizamos la inducción de estas células en medio LB cultivadas aeróbicamente. Cuando las células alcanzaron la fase exponencial, aproximadamente a una D.O._{600nm} cercana a 0.3, se agregó a los cultivos el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM. Las células se recolectaron a las 0.5, 1, 3 y 5 horas después de haber agregado el IPTG. Las células fueron tratadas para extracción del c-di-GMP como se indica en materiales y métodos. Como control negativo se empleó un cultivo de la cepa MG1655 con el vector pSE420. Los extractos obtenidos fueron analizados por HPLC, en una columna Waters C-18 de fase reversa como se indica en materiales y métodos, usando como referencia el estándar de c-di-GMP a una concentración de 1 mg/ml como en el experimento anterior. Debido a que utilizamos una columna diferente, el tiempo

de retención del c-di-GMP estándar para estas condiciones experimentales fue de 5.7 min. Los cromatogramas obtenidos en esta experimento se resumen en la gráfica de la Fig. 61.

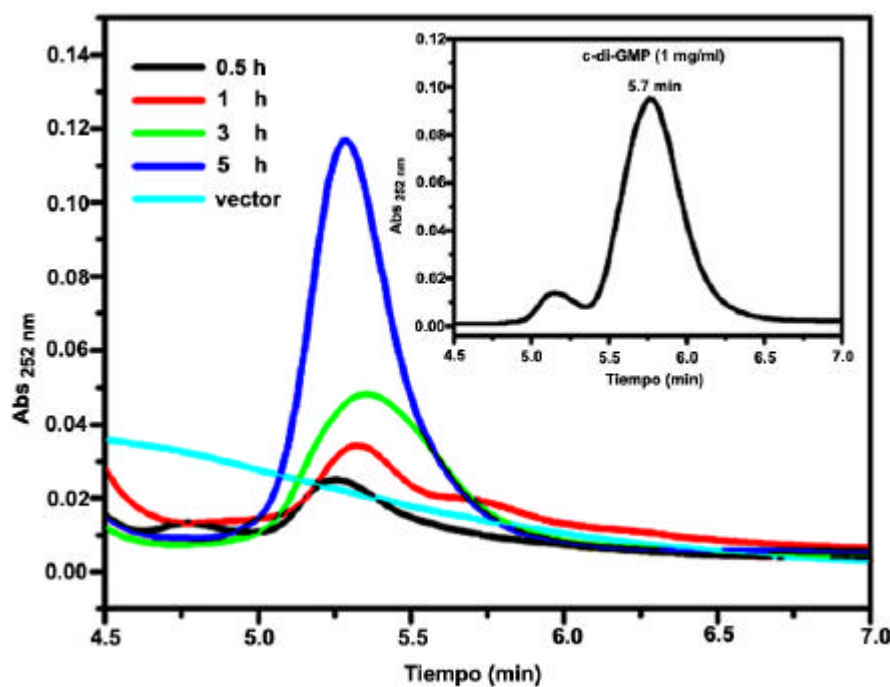


Figura 61. Cinética de producción de c-di-GMP. Cromatogramas obtenidos de un análisis por HPLC de extractos celulares de la cepa MG1655 con el plásmido pYddV, inducidas con IPTG a una concentración final de 1mg/ml. Las células fueron recolectadas a las 0.5, 1, 3 y 5 horas de inducción. Como control negativo se utilizó la cepa MG1655 con el plásmido pSE420 (vector) y como referencia empleamos una solución de c-di-GMP a una concentración final de 1mg/ml (inserto).

La cinética de producción de c-di-GMP, bajo las condiciones experimentales empleadas en este caso, nos indican que el c-di-GMP se acumula en las células que tienen el plásmido pYddV, inducidas con IPTG. Aunque esta determinación no fue cuantitativa, empleamos la misma cantidad de células para cada extracto y los cromatogramas obtenidos nos permiten decir que el c-di-GMP producido es acumulado en estas células pero no en las que sólo tienen el vector pSE420, que fueron recuperadas a las 3 horas después de la adición de

IPTG. Con este experimento nos dimos cuenta que con el plásmido pYddV podemos incrementar súbitamente la cantidad intracelular de c-di-GMP para tener células con alto contenido de c-di-GMP.

6.6 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en el nado

Las altas concentraciones de c-di-GMP en células con el plásmido pYddV inducidas con IPTG, presentaron distintos fenotipos que no nos fue posible observar en las mutantes $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$.

El c-di-GMP ha sido descrito como una molécula que regula la transición de células móviles a no móviles (53). Con la posibilidad de regular las cantidades de c-di-GMP intracelulares, analizamos el efecto de la sobreproducción de este dinucleótido en la motilidad. Realizamos experimentos de motilidad en agar suave como se describe en materiales y métodos, empleando a la cepa W3110 con el plásmido pYddV con y sin IPTG. Como control empleamos células sólo con el vector pSE420 (Fig. 62).

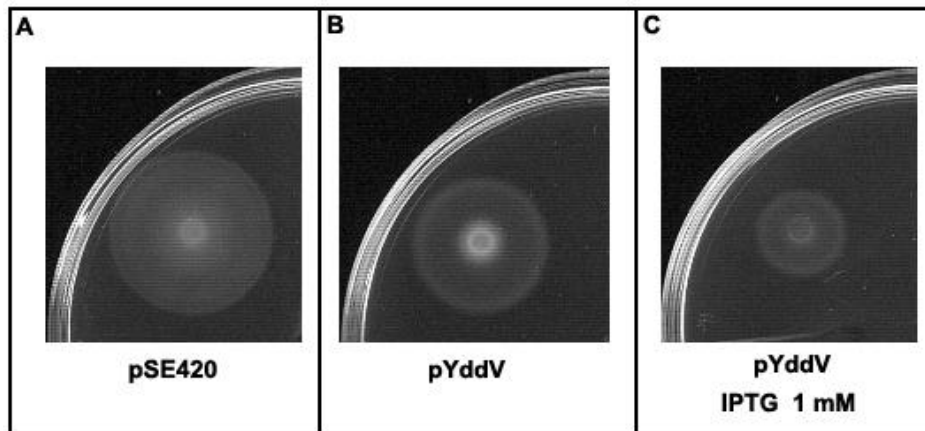


Figura 62. Efecto de un incremento en la concentración de c-di-GMP en el nado. A) Halo de motilidad observado células W3110 con el vector pSE420. B) Nado de células que tienen el plásmido pYddV sin inductor. C) Nado de células con el plásmido pYddV en cajas de agar suave suplementadas con IPTG a una concentración final de 1 mM.

El halo de nado formado por las células con pYddV es menor que el halo formado por las células que sólo tienen el vector pSE420. La disminución del diámetro del halo es más evidente en las células con el plásmido pYddV y que son inoculadas en cajas con IPTG. De este experimento concluimos que de manera consistente con lo reportado en la literatura (53), la sobreproducción de c-di-GMP debida a la sobreproducción de YddV, disminuye la motilidad de las células. El efecto observado por la presencia del plásmido sin el inductor, indica que posiblemente hay una expresión basal del gen *yddV* en el plásmido pYddV, aun sin la adición de IPTG (conocido como “leakage o goteo” de la transcripción), a pesar de que la proteína YddV sintetizada por efecto de esta transcripción basal, no es detectada en los geles de SDS-PAGE (Fig. 59) y tampoco es observada en la detección de c-di-GMP por HPLC (Fig. 60).

6.7 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la formación de biofilm

Además de la motilidad, también la formación de biofilm ha sido uno de los fenotipos analizados en el estudio de proteínas con dominios GGDEF y EAL que sintetizan o hidrolizan c-di-GMP en bacterias (7,23,54,60,71,105). En las mutantes $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$ no logramos ver algún efecto en la formación de biofilm en células de *E. coli*; sin embargo, cuando analizamos el efecto de la sobreproducción de c-di-GMP, encontramos que hay mayor producción de biofilm. En células de las cepas W3110 y TOB1, productoras de biofilm, transformadas con el plásmido pYddV, la cantidad de biofilm formado es mayor que cuando únicamente se encuentra el plásmido pSE420 (Fig. 63).

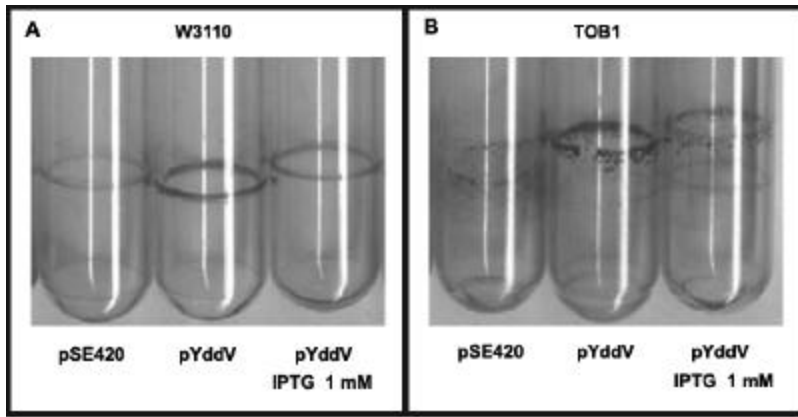


Figura 63. Efecto de la sobreproducción de c-di-GMP en la formación de biofilm. El biofilm formado se observa como un anillo en la interfase aire-líquido mediante la tinción de las células adheridas por el método de tinción por cristal violeta. Para este ensayo empleamos células de las cepas A)W3110 y B)TOB1 con los plásmidos pSE420 y pYddV con y sin IPTG, cultivadas aeróbicamente en medio LB-MOPS.

Al inducir el plásmido pYddV con IPTG, la cantidad de biofilm formado es también mayor, pero menos que con el plásmido sin inductor. Esto concuerda con los resultados del ensayo de nado y sugiere que hay una expresión basal del gen *yddV* en el plásmido pYddV, suficiente para inducir una mayor producción de biofilm en las células. Pero a diferencia de ese ensayo, la formación de biofilm casi no se estimula en altas concentraciones del dinucleótido.

6.8 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la producción de fimbrias y celulosa

La formación de biofilm ha sido correlacionada con la cantidad de matriz extracelular producida por las células (23,54,58,89,106). Esta matriz extracelular está formada por diferentes compuestos que son sintetizados y transportados al exterior de la célula como es el caso del “curli” y la celulosa bacteriana (23,52,54,70). La producción de estos compuestos ha sido estudiada por la adhesión de agentes como el colorante rojo congo o el fluoróforo calcoflúor a la matriz extracelular (20). Por lo anterior, decidimos estudiar el efecto de altos niveles de c-di-GMP en la adhesión de estos compuestos (Fig. 64 y 65).

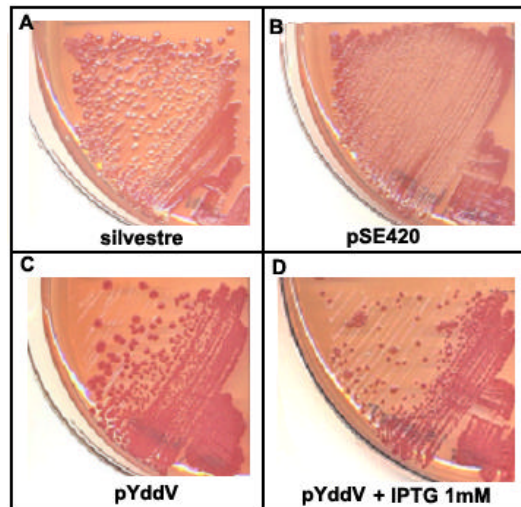


Figura 64. Crecimiento de células de la cepa TOB1 de *E. coli* en placas de LB suplementadas con rojo congo. A) Cepa silvestre TOB1. B) TOB1 con el vector pSE420. C) TOB1 con el plásmido pYddV. D) TOB1 con el plásmido pYddV inducido con IPTG a una concentración final de 1 mM. La producción de “curli” y celulosa se detecta por un aumento en la intensidad del color rojo de las colonias.

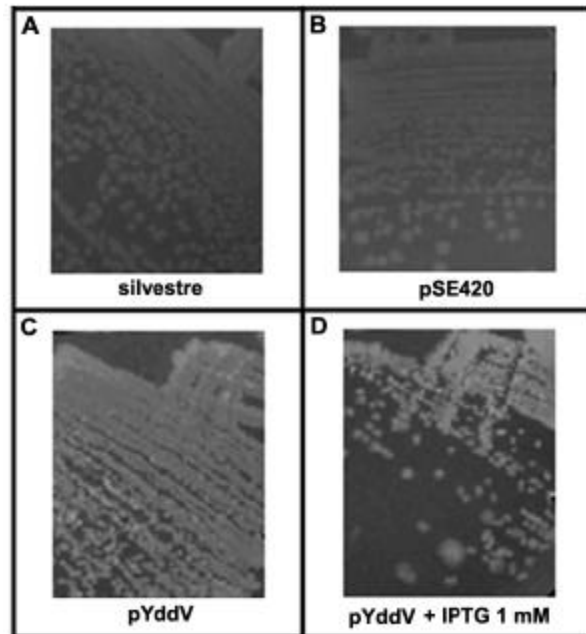


Figura 65. Fluorescencia de derivados de la cepa TOB1 de *E. coli* en placas de LB suplementadas con calcoflúor. A) Cepa silvestre TOB1. B) TOB1 con el vector pSE420. C) TOB1 con el plásmido pYddV. D) TOB1 con el plásmido pYddV inducido con IPTG a una

concentración final de 1 mM. La producción de celulosa se detecta por un aumento en la fluorescencia de las colonias.

La cepa TOB1 es una cepa productora de “curli” y celulosa (fenotipo rdar) como ya se mencionó anteriormente, por lo que en placas de LB suplementadas con rojo congo, crecen colonias de color rojo, mientras que en placas con calcoflúor, las células fluorescen cuando son expuestas a la luz UV de baja longitud de onda (52,53). Al igual que en los ensayos de nado y formación de biofilm, la expresión basal del plásmido pYddV también fue evidente en los ensayos con rojo congo y calcoflúor. Encontramos que en las placas con rojo congo (Fig. 64), la coloración roja de las colonias de la cepa TOB1 es más intensa en las células que tienen el plásmido pYddV sin y con IPTG (Fig. 64C y D) en comparación con las células con niveles silvestres de c-di-GMP (Fig. 64A y B). En las placas suplementadas con calcoflúor, observamos un efecto similar. Las células con el plásmido pYddV sin inducir y con IPTG (Fig. 65C y D), fluorescen más que las que sólo tienen el vector o las silvestres (Fig. 65A y B). Por lo anterior, concluimos que los altos niveles de c-di-GMP incrementan la producción de la matriz extracelular en *E. coli*.

Una observación a partir de estos experimentos es que cuando las células que tienen el plásmido pYddV son inducidas con IPTG en crecimiento en medio sólido (placas), hay un efecto de toxicidad del c-di-GMP pues las colonias no crecen a la misma velocidad ni en la misma abundancia que cuando las células sólo tienen el vector pSE420 o no son inducidas con IPTG. Además, observamos la aparición de algunas colonias que crecen a una velocidad mayor de crecimiento y se ven como colonias más grandes que el promedio. (Figs. 64 D y 65 D).

En crecimiento en medio líquido, la toxicidad debida a los altos niveles de c-di-GMP no es tan evidente, aunque en la curva de crecimiento sí logramos ver un ligero retardo en la velocidad de crecimiento en fase exponencial de la cepa que tiene el plásmido pYddV inducida con IPTG 1 mM comparada con la que sólo tiene el vector pSE420, también tratada con IPTG. Este retardo en el crecimiento es superado en fase estacionaria pues ambas cepas alcanzan la misma densidad óptica alrededor de las 8 horas de crecimiento

(Fig. 66). Probablemente existe una población de mutantes supresoras que pueden contener con los altos niveles de c-di-GMP.

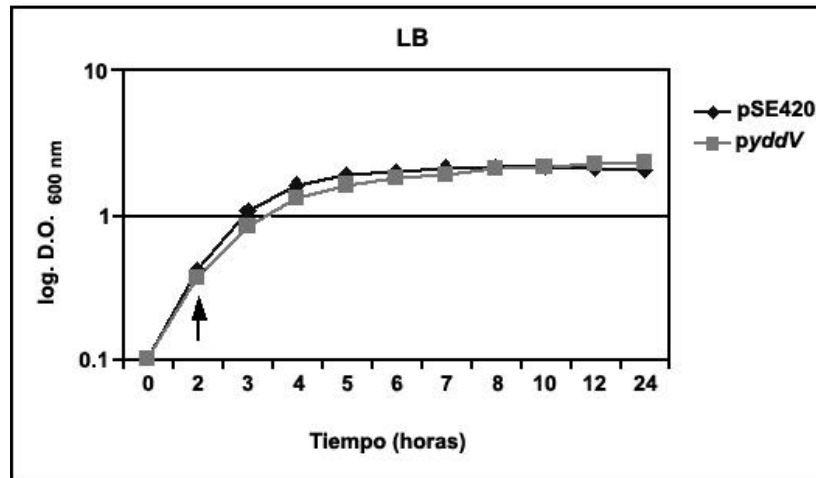


Figura 66. Cinética de crecimiento de las cepas MG1655 con el vector pSE420 y MG1655 con el plásmido pYddV, ambas tratadas con IPTG a una concentración final de 1 mM. La adición del IPTG fue a las 2 horas de crecimiento y se indica con una flecha.

6.9 Microscopía óptica y electrónica de células sobreproductoras de c-di-GMP

Debido a la toxicidad observada en el crecimiento en placas provocada por los altos niveles de c-di-GMP, decidimos observar al microscopio las células para ver si tenían alguna alteración morfológica. Observamos las células en un microscopio óptico que nos facilitó el laboratorio de la Dra. Laura Camarena en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (ver materiales y métodos, Fig. 67).

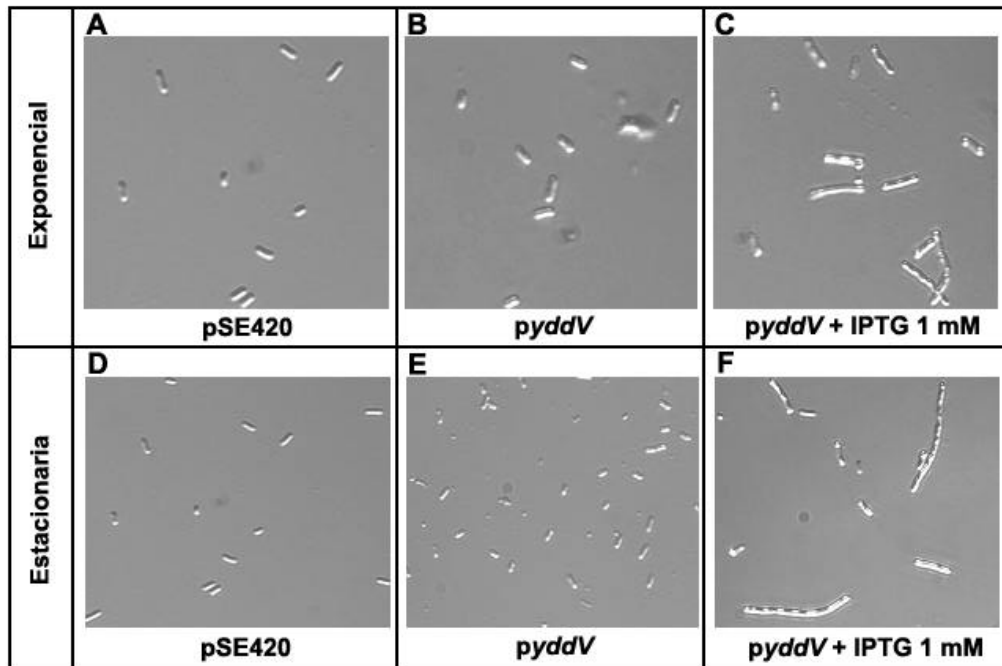


Figura 67. Microscopía óptica de células que tienen el vector pSE420 (A y D), el plásmido pYddV (B y E) y el plásmido pYddV mas IPTG (C y F) en crecimiento en fase exponencial y fase estacionaria. Aumento 600 X en todos los casos.

Cuando las células tienen el vector pSE420 (Fig. 67 A y D) o el plásmido pYddV sin inductor (Fig. 67 B y E), las células muestran una morfología de bacilos, esperada en ambas fases de crecimiento, aunque las células se observan más pequeñas en fase estacionaria; sin embargo, para nuestra sorpresa, cuando se adiciona el IPTG a los medios de cultivo, las células muestran una morfología alargada y en algunos casos se observan filamentos de células (Fig. 67 C y F). Probablemente el efecto tóxico que observamos en placa se debe a esta anomalía en las células.

Analizamos células que sobreexpresan YddV en las cepas MG1655, MC4100, W3110 y TOB1 y en todos los casos observamos las células alargadas (Fig. 68).

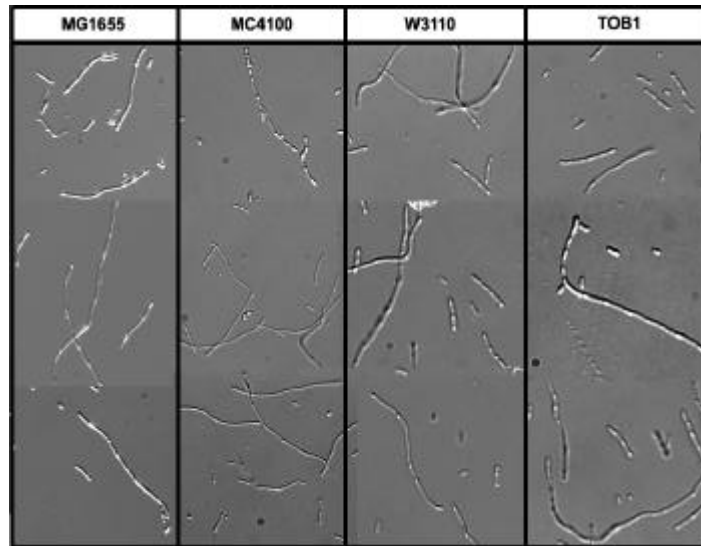


Figura 68. Microscopía óptica en aumento 600X de células que sobreexpresan la proteína YddV en los fondos genéticos MG1655, MC4100, W3110 y TOB1. En todos los casos se observa el alargamiento de las células.

La microscopía óptica no nos permitió determinar si los filamentos observados son grupos de células ordenados en filas o células que no fueron capaces de dividirse. Para resolver este problema, realizamos un análisis de microscopía electrónica de transmisión de las células que acumulan c-di-GMP en el fondo genético MG1655. Este análisis se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Fig. 69).

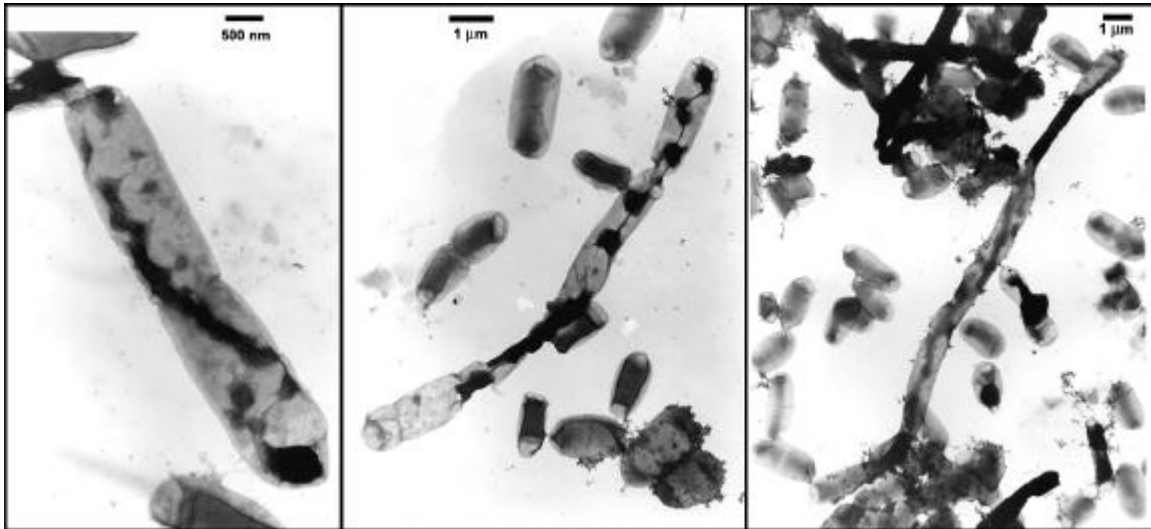


Figura 69. Microscopía electrónica de transmisión de células que sobreproducen c-di-GMP. Las células fueron teñidas negativamente con acetato de uranilo al 1%. En la figura se muestran distintos campos y las barras negras muestran la escala.

Este análisis de microscopía electrónica nos permitió ver que muchas células provenientes de la cepa MG1655 con el plásmido pYddV, tratadas con IPTG 1 mM, son células alargadas, no son agrupaciones en módulos de células sino que son células mucho más largas que lo esperado y algunas alcanzan longitudes de hasta 15 μm , lo que nos hace pensar en una posible deficiencia en la división celular. Por otro lado, estas células tienden a agregarse, algunas muestran estructuras fibrosas que podrían ser parte de la matriz extracelular producida por estas células. Las células alargadas se observan en algunas regiones muy delgadas y compactas en comparación con el resto de las células lo que probablemente significa que las células están de algún modo dañadas, lo que probablemente se refleja como la deficiencia de crecimiento que vemos en placas de LB con IPTG y en las diferencias observadas en la cinética de crecimiento (Fig. 66).

6.10 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la transcripción de genes de *E. coli*

Para tratar de entender qué modificaciones sufren las células cuando hay una acumulación de c-di-GMP, nos apoyamos en la técnica de microarreglos de DNA; con el fin de analizar de un modo general, el efecto que tienen los altos niveles de c-di-GMP en el perfil

transcripcional de *E. coli*. Para realizar este experimento, purificamos RNA total de un cultivo de la cepa MG1655 con el plásmido pSE420 y de un cultivo de la cepa MG1655 con el plásmido pYddV, ambos cultivos fueron preparados en medio LB y se cultivaron hasta fase exponencial ($D.O_{600nm} = 0.3$) y en esa etapa de crecimiento se adicionó IPTG a los cultivos, a una concentración final de 1 mM. Después de 2 horas de inducción con IPTG, las células fueron cosechadas por centrifugación para purificar el RNA mediante la técnica de fenol caliente (ver materiales y métodos, Fig. 70A).

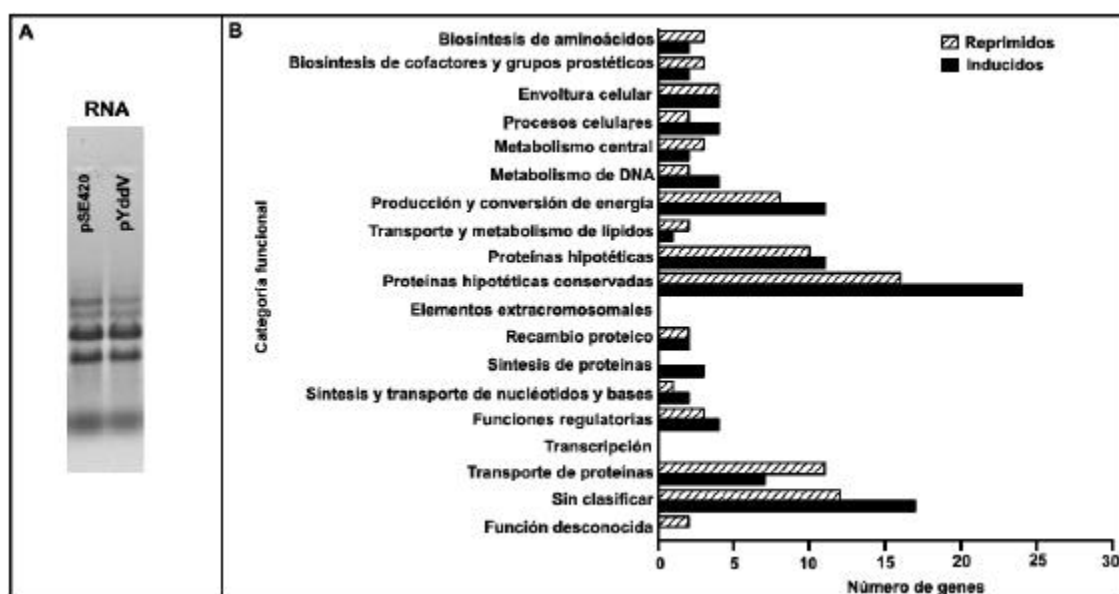


Figura 70. Perfil transcripcional de células con altos niveles de c-di-GMP. A) Gel de agarosa al 1% con tiocianato de guanidina 20mM, en buffer TBE 1X, y teñido con bromuro de etidio 1 μ g/ml, donde se muestra el RNA total extraído de las cepas MG1655 con el vector pSE420 o el plásmido pYddV, tratadas con inducción con IPTG a una concentración final de 1 mM. B) Clasificación funcional de los genes que inducen o reprimen su expresión por efecto de altos niveles de c-di-GMP.

Este experimento fue realizado en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología de la UNAM. Para el análisis de los genes que modificaron su expresión, empleamos el programa GenArise® desarrollado por la misma Unidad de Microarreglos. Se analizaron únicamente los genes que modificaron su expresión en ± 2 DS (desviaciones estándar) del valor promedio de expresión. De 4288 genes analizados, 197 genes modificaron su

expresión, de los cuales, 109 genes incrementaron su expresión (inducidos) y 87 disminuyeron su expresión (reprimidos) en condiciones de altos niveles de c-di-GMP. Estos genes fueron clasificados por la categoría funcional de las proteínas para las cuales codifican (Fig. 70B). El 35% del total de genes que modificaron su expresión caen en la clasificación de proteínas de función desconocida o no asignada.

Dentro de los genes inducidos en condiciones de altos niveles de c-di-GMP, encontramos al gen *rcsA*, que codifica para la proteína RcsA, la cual actúa junto con las proteínas RcsB y RcsC en la regulación transcripcional de genes que participan en diversos procesos como la formación de biofilm, síntesis de cápsula y de flagelo y de ácido colánico y muchos de estos genes, también modificaron su expresión en respuesta a la sobreproducción de c-di-GMP, lo que nos permite sugerir que, en condiciones de altos niveles de c-di-GMP, podrían ocurrir importantes modificaciones de la envoltura celular. Por otro lado, varios genes que codifican para reguladores transcripcionales incrementaron su expresión en altos niveles de c-di-GMP; tal es el caso de *soxS*, que codifica para la proteína SoxS, que es el regulador transcripcional más importante en la respuesta al estrés oxidativo provocado por superóxido. En altos niveles de c-di-GMP, también se observa un incremento en la expresión de varios genes regulados por SoxS, como por ejemplo *fumC*, que codifica para la enzima fumarasa C; *zwf*, que codifica para la enzima glucosa-1,6- fosfatodeshidrogenasa, *acnA*, que codifica para la enzima aconitasa A, entre otros genes, lo que nos permite sugerir que probablemente las modificaciones que provocan los altos niveles de c-di-GMP provoca una situación de estrés celular. Por otro lado, dentro de los genes regulados positivamente por SoxS se encuentra el gen *fur*, el cual también incrementó su expresión en altos niveles de c-di-GMP. A su vez, muchos de los genes regulados por la proteína Fur; que es el regulador transcripcional requerido para la asimilación y metabolismo de hierro; también incrementaron su expresión. Dentro de los genes que se observan reprimidos en condiciones de altos niveles de c-di-GMP, muchos de ellos codifican para posibles proteínas de membrana, lo cual apoya nuestra sugerencia de que hay una modificación importante de la envoltura celular en condiciones de sobreproducción de c-di-GMP. Es interesante que solo uno de los 19 genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF en *E. coli*, el gen *ydaM*, se observa reprimido en condiciones de altos niveles de c-di-GMP,

probablemente existe una represión por producto como se sugiere que ocurre en el caso del operón *yddV-dos*, el cual no se expresa en condiciones de sobreproducción de c-di-GMP.

La lista del total de genes que modificaron su expresión se encuentra en el material suplementario del artículo “Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid” (Anexo 1).

6.11 Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la transcripción del operón *yddV-dos*

Para analizar si los niveles de c-di-GMP tienen algún efecto en la expresión del operón *yddV-dos*, transformamos los plásmidos pSE420 y pYddV a la cepa JMH0923 que tiene la fusión Φ (*yddV-lacZ*). Las células transformantes fueron crecidas hasta una D.O. de aproximadamente 0.3 unidades de absorbancia a 600nm y entonces se trataron con IPTG 1 mM. Las células fueron cosechadas en fase exponencial (D.O._{600nm} = 0.5) y estacionaria (D.O._{600nm} = 1.0) después del tratamiento con IPTG para realizar el ensayo de β -galactosidasa descrito en el capítulo 2 de materiales y métodos (Fig. 71).

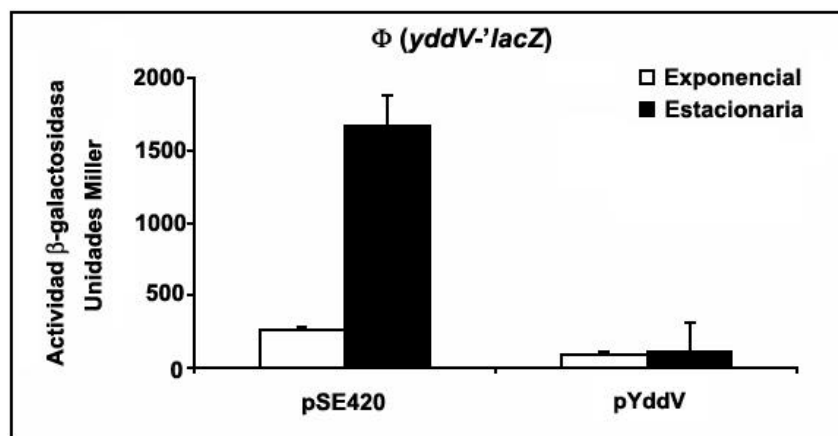


Figura 71. Actividad β -galactosidasa de la fusión Φ (*yddV-lacZ*) en condiciones de alto c-di-GMP (pYddV) comparada con células que tienen niveles silvestres de c-di-GMP (pSE420). Las células en ambos casos fueron tratadas con IPTG 1 mM y cosechadas en fase exponencial y en fase estacionaria para realizar el ensayo.

Encontramos que cuando solamente está presente el vector pSE420, la fusión Φ (*yddV-lacZ*) tiene niveles bajos de expresión en fase exponencial que se inducen en fase estacionaria como se observó en células silvestres (ver Fig. 31); sin embargo, cuando los niveles de c-di-GMP se elevan por la inducción con IPTG del plásmido pYddV, la expresión de la fusión se reprime casi por completo, aun en fase estacionaria (Fig. 71). La represión de la expresión de la fusión también se observó en la cepa que carece de RpoS (Fig. 72), lo que significa que la represión de la expresión del operón *yddV-dos* por altos niveles de c-di-GMP, es independiente de σ^S .

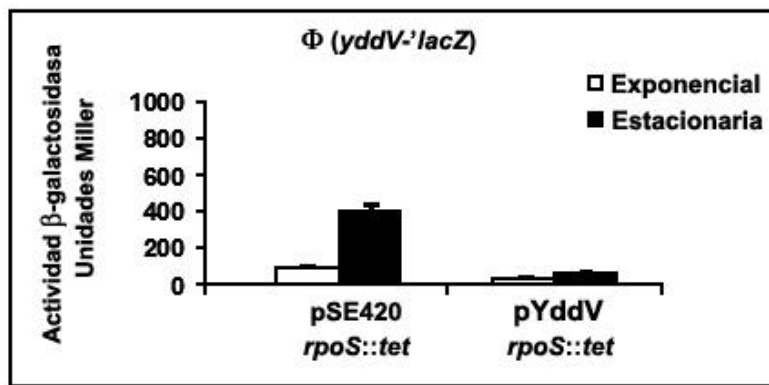


Figura 72. Actividad β -galactosidasa de la fusión Φ (*yddV-lacZ*) en condiciones de alto c-di-GMP (pYddV) comparada con células que tienen niveles silvestres de c-di-GMP (pSE420) y en un fondo genético mutante *rpoS::tet*. Las células en ambos casos fueron tratadas con IPTG 1 mM y cosechadas en fase exponencial y en fase estacionaria para realizar el ensayo.

Estos resultados indican que la expresión del operón *yddV-dos* probablemente está regulada por los niveles intracelulares de c-di-GMP, quizás a través de un factor transcripcional capaz de responder a la presencia o ausencia del segundo mensajero c-di-GMP.

6.12 Discusión

La proteína YddV se reportó por primera vez como una proteína con dominio GGDEF capaz de complementar la producción de celulosa en una mutante en *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, mediante la transformación de células de *R. leguminosarum*

deficiente en el gen *celR2*, que codifica para una de las proteínas determinantes de la producción de celulosa en esta bacteria (21). El gen *yddV* (llamado en ese trabajo *yhck*) fue clonado en un vector bajo la regulación de su propia región promotora, y complementó el fenotipo de producción de celulosa en esas mutantes de *R. leguminosarum*, lo que sugería que podría funcionar como una diguanilato ciclasa que sintetiza el activador alostérico de la celulosa sintasa, c-di-GMP. En nuestro trabajo, para tratar de entender la función del operón *yddV-dos*, clonamos el gen *yddV*, bajo el control de un promotor *trc* inducible por IPTG, proporcionado por el vector pSE420, para poder manipular la expresión de este gen. Con esto se logró sobreproducir una proteína de aproximadamente 53 kDa, que es el peso molecular esperado para la proteína YddV.

Mediante los análisis por HPLC de extractos celulares con sobreproducción de la proteína YddV, logramos identificar la producción del dinucleótido c-di-GMP en estos extractos, lo que indica que la proteína YddV que sobreexpresamos efectivamente tiene función de diguanilato ciclasa.

La sobreproducción de c-di-GMP tiene varios efectos en la fisiología de las células, como por ejemplo la mayor producción de fimbria y/o celulosa, que son componentes de la matriz extracelular y que funcionan como determinantes de la producción de biofilm en muchas bacterias (21,23,52,54,58,62,71,106). Probablemente, el incremento de la producción de biofilm en células que sobreexpresan a la diguanilato ciclasa YddV es debida al incremento en la producción de estos componentes extracelulares. Es interesante que ésta sobreexpresión de la matriz extracelular es observada con la sola presencia del plásmido pYddV, mayor aún que con la inducción de la expresión de *yddV* por IPTG. El mismo fenómeno es observado en la producción de biofilm. Esto indica que hay una expresión basal o “fuga” en el plásmido cuando no está presente el IPTG y esta expresión escapa a la presencia del súper-represor *lacI^q* presente en el vector pSE420. Esta “fuga” de la expresión, es suficiente para observar los fenotipos de mayor producción de exopolímeros como fimbria y celulosa y la mayor formación de biofilm sin que la sobreproducción de la proteína YddV llegue a ser tóxica. Esto nos hace pensar que el c-di-GMP sintetizado por la proteína YddV resultante de la expresión basal del plásmido es una

cantidad importante de c-di-GMP en la célula y que la sobreexpresión por la inducción con IPTG provoca una muy alta producción de c-di-GMP, tan alta que es detectada por HPLC y que resulta tóxica para la célula, provocando un retardo en la velocidad de crecimiento, además de modificaciones en la morfología de la célula y más importante, provocando la alteración del perfil transcripcional de *E. coli*.

6.13 Conclusiones

- 1.- Se clonó correctamente el gen *yddV* en el vector de expresión pSE420 inducible por IPTG.
- 2.- Las células que tienen el plásmido pYddV, inducidas con IPTG, sobreproducen la proteína YddV.
- 3.- La proteína YddV tiene actividad de diguanilato ciclasa, sintetizando c-di-GMP.
- 4.- El c-di-GMP producido como efecto de la sobreexpresión de la proteína YddV es acumulado a lo largo de la inducción con IPTG.
- 5.- La capacidad de nado en agar suave disminuye en células que sobreproducen c-di-GMP.
- 6.- La producción de elementos de la matriz extracelular como celulosa o fimbria agregativa es favorecida en células que tienen los niveles de c-di-GMP incrementados.
- 7.- La formación de biofilm también se incrementa en altos niveles de c-di-GMP, probablemente como consecuencia de la modificación de la matriz extracelular.
- 8.- Entre los efectos que tiene el incremento de la poza de c-di-GMP intracelular, está la modificación de la morfología de las células, produciendo células alargadas y filamentosas.
- 9.- Los altos niveles de c-di-GMP provoca directa o indirectamente modificaciones en el perfil transcripcional de las células de *E. coli*. 109 genes incrementan su expresión mientras que 87 genes son reprimidos. La mayoría de estos genes codifican para proteínas de función desconocida pero muchas de ellas son potenciales proteínas de membrana y reguladores transcripcionales entre otras funciones.
- 10.- La expresión del operón *yddV-dos* es reprimida por altos niveles de c-di-GMP.

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL

Desde su descripción como dominios conservados y reiterados en los genomas bacterianos, los dominios GGDEF y EAL se han ido involucrando cada vez más en distintos procesos de la fisiología bacteriana (7,42,45,104,107). La distribución de múltiples copias de dominios GGDEF y EAL y la demostración en muchos casos de que las proteínas que los contienen funcionan como enzimas responsables de la síntesis y la hidrólisis del dinucleótido c-di-GMP, ha hecho sugerir a algunos autores que esta rama de investigación microbiológica se encuentra en medio del descubrimiento de una nueva red global de transducción de señales en bacterias, donde el c-di-GMP juega el papel principal como segundo mensajero (42,107); sin embargo, los mecanismos en los que participa el c-di-GMP directamente como una molécula señal aún son desconocidos.

La asociación de los dominios GGDEF y EAL a otros dominios de señalización mencionados en la introducción de esta tesis, sugiere que los procesos en los que interviene el c-di-GMP son diversos, probablemente respondiendo a estímulos externos a los que la bacteria tiene que responder y para los que se requiere de una poza disponible de c-di-GMP para inducir la respuesta. Por esto, la expresión de las proteínas GGDEF podría llevarse a cabo de forma temporal y espacial, es decir, la síntesis de proteínas que sintetizan c-di-GMP podría estar restringida a pequeñas pozas en el sitio de la célula donde se requiere, lo que daría especificidad de la respuesta controlada por el c-di-GMP. Un ejemplo que apoya esta teoría es la localización de la proteína PleD (que tiene un dominio GGDEF) de *C. crescentus* en el polo de la célula. La proteína PleD, al concentrarse en un polo de la célula, podría incrementar los niveles de c-di-GMP en ese sitio específico por su actividad de diguanilato ciclasa (50,108). La hipótesis de que el c-di-GMP se encuentra compartimentalizado en la célula, también es apoyado por el trabajo del grupo de U. Romling, que demuestra que las proteínas con dominio GGDEF en *S. typhimurium* tienen distintas capacidades y velocidades de síntesis de c-di-GMP, siendo la proteína AdrA la diguanilato ciclasa responsable de la síntesis de la mayor parte del c-di-GMP detectado en esta bacteria. Además de la velocidad de síntesis de c-di-GMP, la concentración de proteína

con actividad de diguanilato ciclasa es importante para mantener las pozas de c-di-GMP requeridas, así como la actividad y velocidad de hidrólisis de las fosfodiesterasas también (55).

Nuestro trabajo trata de contribuir en el entendimiento de los mecanismos en los que participa el c-di-GMP en la fisiología de *E. coli*, a través del estudio del operón *yddV-dos*, que es un sistema de síntesis e hidrólisis de c-di-GMP codificado en un operón, similar a los operones *cdg* presentes en *G. xylinus* que codifican para tres sistemas de Fosfodiesterasa-Diguanilato ciclasa de c-di-GMP en esa bacteria, aunque en el caso del operón *yddV-dos*, el orden de los genes está invertido, primero está la diguanilato ciclasa y luego la fosfodiesterasa (14). En *E. coli* hay otros dos genes que por su localización en el genoma podrían formar un operón que codifique para otro sistema de control de los niveles de c-di-GMP, los genes *yliE* y *yliF*. El gen *yliE* codifica para una proteína con un dominio GGDEF y el gen *yliF* codifica para una proteína con un dominio EAL. Ambas proteínas YliE y YliF tienen una región transmembranal en su estructura y no tienen otros dominios de señalización asociados (ver Fig. 12); sin embargo, no hay evidencia de que estos genes formen parte de un operón. Por otro lado, los genes *yeaI* y *yeaJ* se encuentran contiguos en el genoma de *E. coli* y podrían formar un operón, pero estos genes codifican para proteínas de membrana con dominios GGDEF únicamente. El resto de los genes que codifican para proteínas que contienen dominios GGDEF y/o EAL no se encuentran en arreglos de tipo operón. Aunque la estructura de las proteínas YddV y Dos sugiere que se trata de proteínas solubles, no se conoce su localización, por lo que sería interesante estudiarlas para tratar de elucidar si se trata de un sistema de control de los niveles de c-di-GMP restringido a una zona localizada de la célula.

Este trabajo proporciona información acerca de la etapa en la que el operón *yddV-dos* es expresado. De acuerdo al análisis de fusiones con el gen *lacZ*, el operón *yddV-dos* se expresa principalmente en fase estacionaria bajo el control de RpoS en crecimiento aeróbico, mientras que en anaerobiosis el operón presenta una baja expresión. Recientemente se publicó un trabajo que confirma la participación de RpoS en la regulación de este operón (109). Esta información indica que además de la velocidad de síntesis o degradación del c-di-GMP, o de la inhibición por producto como en el caso de

PleD de *C. crescentus*, la activación diferencial de las diguanilato ciclasas y las fosfodiesterasas por diferentes estímulos ambientales como la etapa de crecimiento o a las condiciones de cultivo serán otros determinantes que podrían restringir las concentraciones de c-di-GMP en la célula.

Las mutantes $\Delta dos::kan$ y $\Delta yddV-dos::kan$ no mostraron un efecto dramático evidente en la fisiología de la célula. Una posible explicación es que la ausencia de las proteínas codificadas por estos genes sea compensada por la actividad de alguna otra proteína con la misma actividad, de las otras proteínas con dominios GGDEF y EAL que hay en *E. coli*; sin embargo, la falta de estos genes al menos produce una modificación en la morfología de las células; en ambas mutantes se observa un ligero alargamiento de las células, como previamente lo observó el grupo de T. Shimizu en una mutante en el gen *dos* (103).

Aunque no tenemos evidencia de que exista un rompimiento del balance de la síntesis e hidrólisis de c-di-GMP en estas mutantes, el análisis del microarreglo de la mutante $\Delta yddV-dos::kan$ indica que varios genes modifican su expresión por efecto de la ausencia del sistema YddV-Dos. Entre los genes que modificaron su expresión, se encuentran algunos que codifican para proteínas que participan en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos y la mayoría son proteínas de función no determinada. Aún no podemos establecer una relación directa entre los genes que modificaron su expresión en ausencia del operón *yddV-dos* con el alargamiento de las células o el ligero retardo en la velocidad de crecimiento de estas mutantes, pero al menos es evidente que la ausencia de las proteínas YddV y Dos no es del todo compensada por otras proteínas con la misma actividad.

Como ya se había observado en otras bacterias, el efecto de elevar los niveles de c-di-GMP afecta principalmente la motilidad de las células y la capacidad de formar biofilm, debido a modificaciones en la síntesis de exopolisacáridos y estructuras que modifican la adherencia de las células a distintas superficies (53,54,58,63,67,71,71,110). El aumento en la producción de YddV provoca una acumulación del c-di-GMP intracelular, que incrementó la capacidad de las células de *E. coli* de formar biofilm, de producir fimbria y celulosa, además de que disminuyó la motilidad como ya se había observado en *S. typhimurium* (53).

El fenotipo más evidente en *E. coli* al incrementar los niveles de c-di-GMP fue la formación de células alargadas y de morfología distorsionada. Un cálculo de la cantidad total de c-di-GMP intracelular en *S. typhimurium*, señala que hay alrededor de 100 veces más GTP en la célula comparada con la cantidad de c-di-GMP, pero cuando se sobreexpresa la diguanilato AdrA, la cantidad de c-di-GMP es 10 veces mayor que la de GTP (53). Un incremento súbito en la producción de c-di-GMP resultaría en una disminución importante de la poza de GTP, pues es el sustrato requerido para la síntesis del dinucleótido (Fig. 73).

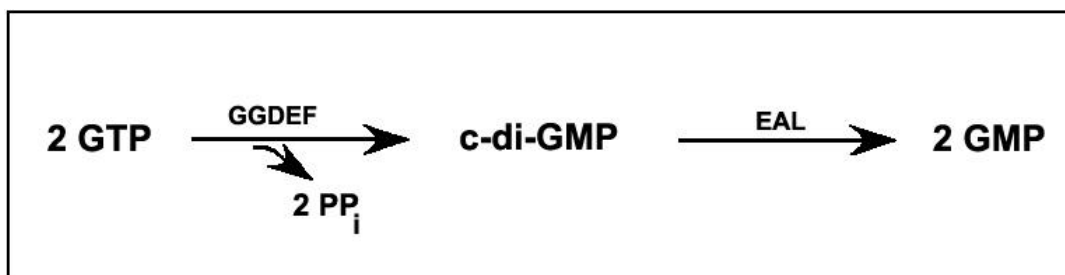


Figura 73. Reacciones generales de la síntesis e hidrólisis de c-di-GMP por los dominios GGDEF y EAL.

La disminución de los niveles intracelulares de GTP requerido para la síntesis de RNA y la traducción, es probablemente la explicación de la disminución en la velocidad de crecimiento entre las células que sobreexpresan YddV comparadas con las que sólo tienen el vector pSE420 (Fig. 66) y aun más evidente en el crecimiento en cajas con IPTG de las cepas que tienen el plásmido pYddV (Fig. 64D y 65D). En estas cajas, es común encontrar la aparición de posibles mutantes supresoras que crecen a mayor velocidad que el resto de las células, mostrándose como colonias más grandes. Probablemente se trate de la selección de algunas mutantes que pueden contender con los niveles altos de c-di-GMP o de células que adquirieron mutaciones en el plásmido que ya no permiten la sobreexpresión de la proteína YddV.

El análisis de perfil transcripcional de células que sobreproducen c-di-GMP mostró que un porcentaje importante del genoma (4.5%) sufre modificaciones en expresión. La mayoría

de los genes que se modifican codifican proteínas de función desconocida pero muchas de ellas de posible localización membranal. Otras de estas proteínas son de envoltura celular y síntesis de exopolisacáridos. En estudios recientes en *V. cholerae* sobre el perfil transcripcional en presencia de altos niveles de c-di-GMP, encuentran resultados similares a los reportados en nuestro trabajo(111). Es interesante que dentro de los genes que modificaron su expresión en respuesta a altas cantidades de c-di-GMP intracelulares, algunos de los genes inducidos codifican para reguladores transcripcionales cuyos blancos son conocidos como el caso de la proteína SoxS (Fig. 74A), que regula positivamente genes que codifican para proteínas importantes en la respuesta al estrés oxidativo provocado por superóxido (112). Entre los genes regulados por SoxS se encuentra el gen *fur*, que codifica para el regulador transcripcional Fur (Fig. 74B), importante en la regulación de genes que codifican para proteínas que participan en el transporte y utilización de hierro en la célula (113). El regulador RcsA (Fig. 74C) que junto con las proteínas RcsB y RcsC, participa en una compleja red de transducción de señales dentro de la cual es reprimido el llamado operón maestro *flhDC* que controla la expresión de más de 50 genes importantes en la síntesis del flagelo (114), lo que podría ser una explicación a la deficiencia en nado de las células que sobreexpresan la proteína YddV.

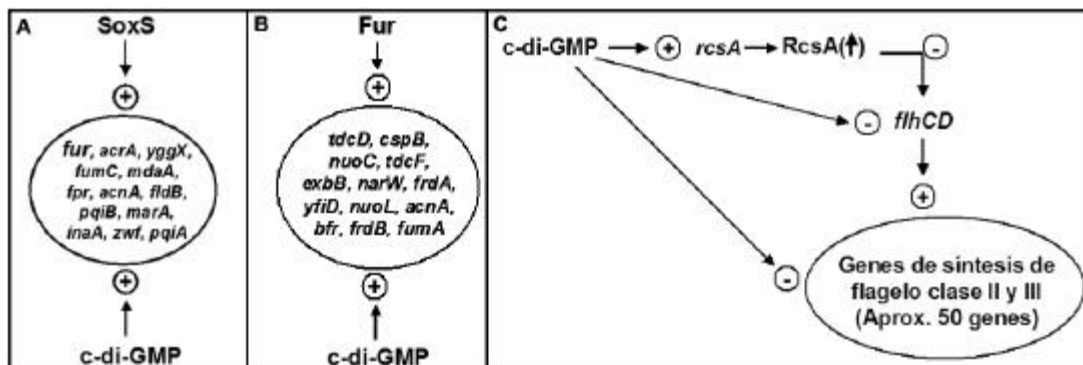


Figura 74. Genes regulados por los factores transcripcionales SoxS (A), Fur (B) y RcsA (C) que también son regulados por los altos niveles de c-di-GMP inducidos por la sobreproducción de la diguanilato ciclasa YddV.

Finalmente la represión de la expresión del operón *yddV-dos* por los altos niveles de c-di-GMP sugiere que puede existir un tipo de regulación transcripcional dependiente de c-di-

GMP, probablemente a través de reguladores transcripcionales capaces de detectar la presencia o ausencia de c-di-GMP. La primera proteína reportada que une directamente c-di-GMP fue la subunidad A de la celulosa sintasa BcsA, también conocida como proteína CDGBP (c-di-GMP binding protein, Fig. 3) cuando se demostró que el c-di-GMP actúa como un activador alostérico en la síntesis de celulosa en *G. xylinus* (93). Diez años después, un estudio bioinformático propuso que el dominio responsable de la unión del c-di-GMP es el llamado dominio PilZ que forma parte de la proteína BcsA (115). Muy recientemente, este dominio PilZ también fue encontrado en la proteína YcgR de *E. coli*, que regula la motilidad debida al flagelo de una manera dependiente de c-di-GMP mediante su unión al dominio PilZ (116). Además de PilZ, es muy probable que existan otros dominios aún desconocidos de unión a c-di-GMP pues el dominio PilZ no se encuentra en muchas especies bacterianas que codifican en sus genomas proteínas con dominios GGDEF y EAL. Por otro lado, la estructura cristalina de PleD mostró que dímeros de c-di-GMP pueden unirse a la proteína PleD en el “sitio I” para inhibir alostéricamente la síntesis del dinucleótido (51). Posteriormente se demostró que el “sitio I” consta de un motivo RXXD presente en la mayoría de los dominios GGDEF descritos, y que la inhibición por producto de las diguanilato ciclasas puede ser uno de los principales mecanismos para la señalización por c-di-GMP (117); sin embargo, ningún factor transcripcional se ha reportado que pueda unir directamente c-di-GMP.

CAPÍTULO 8. PERSPECTIVAS

Muchos de los aspectos que involucran la síntesis y degradación del c-di-GMP, la identificación de las proteínas que catalizan estas reacciones y los procesos fisiológicos en los que participan han avanzado significativamente en los últimos cuatro años. Es evidente que los mecanismos de transducción de señales dependientes de c-di-GMP aún no son del todo claros pero se sabe que tienen implicaciones en procesos como virulencia, producción de exopolisacáridos, formación de biofilm, interacciones célula-célula, célula-superficie, modulación de la superficie celular y diferenciación celular.

Para ampliar la contribución de nuestro laboratorio en el metabolismo del c-di-GMP en *E. coli* y a raíz de este trabajo doctoral, han surgido varias líneas de investigación en el laboratorio. En primer lugar, se intenta encontrar algún regulador transcripcional que responda a los niveles de c-di-GMP. Para esto se hará una búsqueda de mutantes capaces de expresar el operón *yddV-dos* en condiciones de altos niveles de c-di-GMP, utilizando como herramienta principal la fusión $\Phi(yddV-lacZ)$ como monitor de la expresión.

En *E. coli*, existe una proteína, YahA, que contiene en su extremo amino un dominio HTH de unión a DNA que pertenece a la familia LuxR en el carboxilo terminal un dominio EAL (Fuente Swiss-Prot Database, <http://ca.expasy.org>, Fig. 12). Esta proteína es uno de los candidatos principales a ser un regulador transcripcional que responde a c-di-GMP debido a la presencia del dominio HTH, por lo que se tiene contemplado el análisis de esta proteína para saber si efectivamente es un regulador transcripcional funcional, además de buscar posibles genes blancos y analizar la participación del c-di-GMP en su actividad.

Por otro lado, el análisis de los efectos en el perfil transcripcional de *E. coli* en altos niveles de c-di-GMP proporcionó datos que nos permiten proponer que las células se encuentran en un estado de estrés general que se refleja en una deficiencia en el crecimiento, una modificación de la morfología y la expresión de genes propios de respuesta al estrés oxidativo como se mencionó anteriormente, por lo que sería interesante analizar el papel

del c-di-GMP en distintas condiciones de estrés como el oxidativo, térmico y osmótico así como analizar el grado de oxidación general de las proteínas mediante análisis de carbonilación y estudiar si los niveles de c-di-GMP tienen algún efecto en el grado de oxidación de las proteínas.

La expresión del operón *yddV-dos* ocurre únicamente en condiciones de crecimiento aeróbico, por lo que podemos sugerir que el sistema de recambio de c-di-GMP por las proteínas YddV y Dos es propio del metabolismo aeróbico de *E.coli*; sin embargo, al ser una bacteria facultativa, es probable en anaerobiosis existan otros sistemas que participen en regular los niveles de c-di-GMP a cargo de algunas de las otras proteínas con dominos GGDEF y EAL que tiene la bacteria y cuya función aún es desconocida. Dentro del trabajo a realizar se tiene contemplado el análisis del efecto de altos y bajos niveles de c-di-GMP en el metabolismo anaeróbico de *E.coli*.

Para lograr bajos niveles de c-di-GMP se está trabajando en la sobreproducción de fosfodiesterasas de c-di-GMP como la proteína Dos o la proteína YhjH que únicamente está conformada por un dominio EAL capaz de hidrolizar c-di-GMP.

REFERENCIAS

1. Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glaner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. R., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) *Science* 277, 1453-1462
2. Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R., and Wanner, B. L. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 4956-4972
3. Hoch, J. (2000) *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 165-170
4. Lewis, R. J., Brannigan, J. A., Muchova, K., Barak, I., and Wilkinson, A. J. (1999) *J. Mol. Biol.* 294, 9-15
5. Stulke, J. and Hillen, W. (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 195-201
6. Magnusson, L. U., Farewell, A., and Nystrom, T. (2005) *Trends Microbiol.* 13, 236-242
7. D'Argenio, D. A. and Miller, S. I. (2004) *Microbiology* 150, 2497-2502
8. Egli, M., Gessner, R., Williams, L., Quigley, G., van der Marel, G., van Boom, J., Rich, A., and Frederick, C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3235-3239
9. Liaw, Y. C., Gao, Y. G., Robinson, H., Sheldrick, G. M., Sliedregt, L. A., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Wang, A. H. (1990) *FEBS Lett.* 264, 223-227
10. Zhang, Z., Gaffney, B., and Jones, R. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16700-16701
11. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., and Benziman, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18933-18943
12. Kimura, S., Chen, H. P., Saxena, I. M., Brown Jr, R. M., and Itoh, T. (2001) *J. Bacteriol.* 183, 5668-5674
13. Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, H., Michaeli, P., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1986) *Carbohydr. Res.* 49, 101-117
14. Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., and Benziman, M. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 4416-4425
15. Legge, R. L. (1990) *Biotechnol. Adv.* 8, 303-319

16. Romling, U. (2002) *Res. Microbiol.* 153, 205-212
17. Méndez-Ortiz, M. M. and Membrillo-Hernández, J. (2004) *TIP Rev. Esp. C. Quím. Biol.* 7, 26-34
18. Matthyse, A. G., Holmes, K. V., and Gurlitz, R. H. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 583-955
19. Matthyse, A. G., White, S., and Lightfoot, R. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 1069-1075
20. Zevenhuizen, L. P., Bertocchi, C., and van Neerven, A. R. (1986) *Antonie Van Leeuwenhoek* 52, 381-386
21. Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H., and Lindberg, M. (1999) *Microbiology* 145, 1253-1262
22. Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Lindberg, M. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 163-167
23. Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) *Mol. Microbiol.* 43, 793-808
24. Shapiro, J. A. (1998) *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 81-104
25. Romling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., and Normark, S. (1998) *Mol. Microbiol.* 28, 249-264
26. Romling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S., and Reinkoster, J. (2000) *Mol. Microbiol.* 36, 10-23
27. Romling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M., and Tschape, H. (2003) *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 273-285
28. Romling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., and Normark, S. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 722-731
29. Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., and Dorel, C. (2001) *J. Bacteriol.* 183, 7213-7223
30. Galperin, M. Y., Nikolskaya, N., and Koonin, E. V. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 11-21
31. Pei, J. and Grishin, N. V. (2001) *Proteins* 42, 210-216
32. Merkel, T. J., Barros, C., and Stibitz, S. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 1682-1690
33. Galperin, M. Y. (2004) *Environ. Microbiol.* 6, 552-567

34. Nikolskaya, A. N., Mulkidjanian, A. Y., Beech, I. B., and Galperin, M. Y. (2003) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5, 11-16
35. Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N., and Galperin, M. Y. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 285-294
36. Taylor, B. L. and Zhulin, I. B. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 479-506
37. Gilles-Gonzalez, M. A. (2001) *IUBMB Life* 51, 165-173
38. Ulrich, L. E., Koonin, E. V., and Zhulin, I. B. (2005) *Trends Microbiol.* 13, 52-56
39. Galperin, M. Y., Gaidenko, T. A., Mulkidjanian, A. Y., Nakano, M., and Price, C. W. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 205, 17-23
40. Shu, C. J., Ulrich, L. E., and Zhulin, I. B. (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 121-124
41. Iyer, L., Anantharaman, V., and Aravind, L. (2003) *BMC Genomics* 4, Publicación en línea
42. Romling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M. Y. (2005) *Mol. Microbiol.* 57, 629-639
43. Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1991) *Microbiol. Rev.* 55, 35-58
44. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Benziman, M. (1987) *Nature* 325, 279-281
45. Romling, U. and Amikam, D. (2006) *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 218-228
46. Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V., and Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 1792-1798
47. Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P., and Jenal, U. (2003) *Mol. Microbiol.* 47, 1695-1708
48. Jacobs, C., Hung, D., and Shapiro, L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 4095-4100
49. Aldridge, P. and Jenal, U. (1999) *Mol. Microbiol.* 32, 379-391
50. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) *Genes Dev.* 18, 715-727
51. Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., and Schirmer, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 17084-17089

52. Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Romling, U. (2001) *Mol. Microbiol.* 39, 1452-1463
53. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Romling, U. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 1123-1134
54. García, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C., and Lasa, I. (2004) *Mol. Microbiol.* 54, 264-277
55. Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Romling, U. (2006) *Mol. Microbiol.* 60, 602-616
56. Hisert, K. B., Maccoss, M., Shiloh, M. U., Darwin, K. H., Singh, S., Jones, R. A., Ehrhart, S., Zhang, Z., Gaffney, B. L., Gandotra, S., Holden, D. W., Murray, D., and Nathan, C. (2005) *Mol. Microbiol.* 56, 1234-1245
57. Rashid, M. H., Rajanna, C., Ali, A., and Karaolis, D. K. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.* 227, 113-119
58. Tischler, A. D. and Camilli, A. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 857-869
59. Tischler, A. D., Lee, S. H., and Camilli, A. (2002) *J. Bacteriol.* 184, 4104-4113
60. Bomchil, N., Watnick, P., and Kolter, R. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 1384-1390
61. Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., and Greenberg, E. P. (2000) *Nature* 407, 762-764
62. Drenkard, E. and Ausubel, F. M. (2002) *Nature* 416, 740-743
63. Haussler, S. (2004) *Environ. Microbiol.* 6, 546-551
64. D'Argenio, D. A., Calfee, M. W., Rainey, P. B., and Pesci, E. C. (2002) *J. Bacteriol.* 184, 6481-6489
65. Huang, B., Whitchurch, C. B., and Mattick, J. S. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 7068-7076
66. Perry, R. D., Bobrov, A. G., Kirillina, O., Jones, H. A., Pedersen, L., Abney, J., and Fetherston, J. D. (2005) *J. Bacteriol.* 186, 1638-1647
67. Kirillina, O., Fetherston, J. D., Bobrov, A. G., Abney, J., and Perry, R. D. (2004) *Mol. Microbiol.* 54, 75-88
68. Simm, R., Fetherston, J., Kader, A., Romling, U., and Perry, R. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 6816-6823

69. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., and Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 4774-4781
70. Da Re, S. and Ghigo, J. M. (2006) *J. Bacteriol.* 188, 3073-3087
71. Thormann, K. M., Dutter, S., Saville, R. M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., and Spormann, A. M. (2006) *J. Bacteriol.* 188, 2681-2691
72. Méndez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Membrillo-Hernández, J. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 8090-8099
73. Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2000) *Biochemistry* 39, 2685-2691
74. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 23821-23827
75. Kurokawa, H., Lee, D. S., Watanabe, M., Sagami, I., Mikami, B., Raman, C. S., and Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 20186-20193
76. Park, H., Suquet, C., Satterlee, J. D., and Kang, C. (2004) *Biochemistry* 43, 2738-2746
77. Yoshimura, T., Sagami, I., Sasakura, Y., and Shimizu, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 53105-53111
78. Taguchi, S., Matsui, T., Igarashi, J., Sasakura, Y., Araki, L., Ito, O., Sugiyama, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 3340-3347
79. Tomita, T., Gonzalez, G., Chang, A. L., Ikeda-Saito, M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2002) *Biochemistry* 41, 4819-4826
80. Sato, A., Sasakura, Y., Sagami, I., Shimizu, T., Mizutani, Y., and Kitakawa, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 32650-32658
81. Watanabe, M., Kurokawa, H., Yoshimura-Suzuki, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 3937-3942
82. Hirata, S., Matsui, T., Sasakura, Y., Sugiyama, S., Yoshimura, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270, 4771-4779
83. Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E. C. (2000) *J. Bacteriol.* 182, 3858-3862
84. Wackernagel, W. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 306-311
85. Chaverroche, M., Ghigo, J., and d'Enfert, C. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, E97
86. Casadaban, M. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 541-555

87. Imamura, R., Yamanaka, K., Ogura, T., Hiraga, S., Fujita, N., Ishihama, A., and Niki, H. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 25423-25429
88. Elliott, T. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 245-253
89. Pratt, L. and Kolter, R. (1998) *Mol. Microbiol.* 30, 285-293
90. Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
91. Winans, S., Elledge, S., Krueger, J., and Walker, G. C. (1985) *J. Bacteriol.* 161, 1219-1221
92. Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645
93. Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., and Benziman, M. (1997) *FEBS Lett.* 416, 207-211
94. Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 440-450
95. Corona-Izquierdo, F. P. and Membrillo-Hernández, J. (2002) *Res. Microbiol.* 153, 181-185
96. Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991) *Nature* 350, 170-172
97. Chang, A. L., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2001) *Biochemistry* 40, 3420-3426
98. Lee, S. J. and Gralla, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 30064-30071
99. Villarroya, M., Perez-Roger, I., Macian, F., and Armengod, M. E. (1998) *EMBO J.* 17, 1829-1837
100. Aviv, L., Gilaldi, H., Schreiber, G., Oppenheim, A. B., and Glaser, G. (1994) *Mol. Microbiol.* 14, 1021-1031
101. Takahashi, H. and Shimizu, T. (2006) *Chem. Lett.* 35, 970-971
102. Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., and Romling, U. (2003) *Infect. Immun.* 71, 4151-4158
103. Yoshimura-Suzuki, T., Sagami, I., Yokota, N., Kurokawa, H., and Shimizu, T. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 6678-6682

104. Jenal, U. (2005) *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 185-191
105. Yildiz, F. H. and Schoolnik, G. K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4028-33
106. Spiers, A. J., Bohannon, J., Bohannon, J., and Rainey, P. B. (2003) *Mol. Microbiol.* 50, 15-27
107. Jenal, U. and Malone, J. (2006) *Annu. Rev. Genet.* 40, 385-407
108. Jenal, U. and Stephens, C. (2002) *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 558-563
109. Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., and Hengge, R. (2006) *Mol. Microbiol.* 62, 1014-1034
110. Karaolis, D. K., Rashid, M. H., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M., and Hayakawa, Y. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1029-1038
111. Beyhan, S., Tischler, A. D., Camilli, A., and Yildiz, F. H. (2006) *J. Bacteriol.* 188, 3600-3613
112. Pomposiello, P. J. and Demple, B. (2000) *J. Bacteriol.* 182, 23-29
113. Escolar, L., Pérez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) *J. Bacteriol.* 181, 6223-6229
114. Majdalani, N. and Gottesman, S. (2006) *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 379-405
115. Amikam, D. and Galperin, M. Y. (2006) *Bioinformatics* 22, 3-6
116. Ryjenkov, D. A., Simm, R., Romling, U., and Gomelsky, M. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 30310-30314
117. Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., and Jenal, U. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 32015-32024

ANEXO 1

Genome-wide Transcriptional Profile of *Escherichia coli* in Response to High Levels of the Second Messenger 3',5'-Cyclic Diguanylic Acid^{*†‡}

Received for publication, September 30, 2005, and in revised form, January 4, 2006. Published, JBC Papers in Press, January 17, 2006, DOI 10.1074/jbc.M510701200.

M. Marcela Méndez-Ortiz^{1,1}, Mamoru Hyodo⁵, Yoshihiro Hayakawa⁵, and Jorge Membrillo-Hernández^{1,2}

From the ¹Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico and the ²Graduate School of Information Science/Human Informatics and CREST/JST, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan

Cyclic diguanylic acid (c-di-GMP; cGpGp) is a global second messenger controlling motility and adhesion in bacterial cells. Intracellular concentrations of c-di-GMP depend on two opposite activities: diguanylate cyclase, recently assigned to the widespread GGDEF domain, and c-di-GMP-specific phosphodiesterase, associated with proteins harboring the EAL domain. To date, little is known about the targets of c-di-GMP in the cell or if it affects transcriptional regulation of certain genes. In order to expand our knowledge of the effect of this molecule on the bacterial metabolism, here we report on the *Escherichia coli* transcriptional profile under high levels of c-di-GMP. We show that an important number of genes encoding cell surface and membrane-bound proteins are altered in their transcriptional activity. On the other hand, genes encoding several transcriptional factors, such as Fur, RcsA, SoxS, and ZraR, are up-regulated, and others, such as GadE, GadX, GcvA, and MetR, are down-regulated. Transcription of motility and cell division genes were altered, and consistent with this was the physiological analysis of cells overexpressing *yddV*, a diguanylate cyclase; these cells displayed an abnormal cell division process when high levels of c-di-GMP were present. We also show evidence that the diguanylate cyclase gene *yddV* is co-transcribed with *dos*, a heme base oxygen sensor with c-di-GMP-specific phosphodiesterase activity. A *Δdos*-kan mutation rendered the cells unable to divide properly, suggesting that *dos* and *yddV* may be part of a fine-tuning mechanism for regulating the intracellular levels of c-di-GMP.

Both prokaryotes and eukaryotes use selected small molecules, commonly referred to as second messengers, to regulate cell function. The best known second messengers besides calcium are cyclic adenosine- and guanosine monophosphates, cAMP and cGMP, respectively. Prokaryotes and eukaryotes use cAMP, whereas cGMP is used primarily by eukaryotes. Recently, the guanine nucleotide, cyclic dinucleotide GMP (c-di-GMP²; 3',5'-cyclic diguanylic acid, cGpGp) (Fig. 1) was identified

as a novel intracellular bacterial signaling molecule whose structure is known and consists of two cGMP molecules joined by a 3',5'-phosphodiester bond (1, 2) (Fig. 1). c-di-GMP was first identified in *Glaucobacter xylinus* (formerly *Acetobacter xylinum*) and was shown to regulate cellulose production in this species (2–4), in which c-di-GMP binds to and activates the cellulose synthase BcsB. However, increasing evidence has demonstrated that c-di-GMP acts as an important signaling molecule in a variety of bacterial species influencing various aspects of physiology and behavior, such as motility, biofilm formation, virulence, and cell-cell interactions (for a review, see Ref. 5). These findings indicate that c-di-GMP signaling is widespread and that, like cAMP and cGMP, it is a ubiquitous signaling molecule. However, little is known about the targets of this molecule in the cell or if it affects transcriptional regulation of certain genes.

The intracellular levels of c-di-GMP are regulated by the opposing activities of two types of enzymes, diguanylate cyclases (DGC) and c-di-GMP phosphodiesterases (PDE) (3, 6, 7). DGC converts two molecules of GTP via the linear intermediate diguanosine tetraphosphate (pppG3'p5'G) into c-di-GMP, and, by contrast, PDE hydrolytically cleaves the cyclic compound into GMP via the intermediate pG3'p5'G (2, 6, 7). The identification of two domains, GGDEF (the name of this domain is due to the conserved GG(D/E)(D/E)F amino acid sequence pattern) and EAL, shared by all of the DGC and PDE isoenzymes suggested that either or both domains were involved in the diguanylate cyclase activity (8). Remarkably, the GGDEF domain is very abundant in the genomes of free living bacteria, but most of the GGDEF proteins have not yet been experimentally characterized (9). Recent evidence by the groups of Römling and Gomelsky (7, 10, 11) unequivocally showed that GGDEF and EAL protein domains are involved in the c-di-GMP synthesis and hydrolysis, respectively. In addition, three very recent reports demonstrated that EAL domains are indeed Mg²⁺- or Mn²⁺-dependent cyclic diguanylate phosphodiesterases whose activity is inhibited by Ca²⁺ or Zn²⁺ (6, 7, 12). Interestingly, GGDEF and EAL domains are found only in bacteria and are not present in Archaea or Eukarya (13), strongly suggesting that c-di-GMP-mediated signaling is an exclusive bacterial trait. It is noteworthy that proteins with GGDEF or EAL domains are reiterated in bacterial genomes; for example, *Escherichia coli* K-12 bears 19 proteins with the GGDEF domain and 17 with the EAL domain, but importantly, the GGDEF and EAL domains are usually found in multidomain proteins at the COOH-terminal end of often multiple sensory and signal transduction domains (5).

In order to shed light on the regulatory mechanisms where c-di-GMP may be involved in the bacterial metabolism, here we report on the genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* after an abrupt increase in c-di-GMP intracellular levels. It is shown that around 4% of the total genes are affected in their transcriptional activity and that high levels of c-di-GMP affect cellular processes, such as cellular division and

* This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Grants IN205200 and IN207703 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Mexico Grants J33369 and 42580. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org/>) contains supplemental Tables I–IV.

‡ Recipient of a Ph.D. studentship from CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

To whom correspondence should be addressed: Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P. O. Box 70–228, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, México. Tel.: 52-55-56223840; Fax: 52-55-56223855; E-mail: jmh@biomedicas.unam.mx.

The abbreviations used are: c-di-GMP, 3',5'-cyclic diguanylic acid; PDE, phosphodiesterase; DGC, diguanylate cyclase(s); IPTG, isopropyl 1- β -D-thio- β -D-galactopyranoside; RT, reverse transcription.

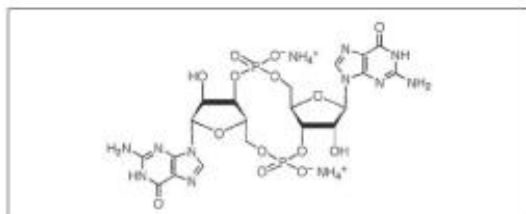


FIGURE 1. Chemical structure of *c*-di-GMP.

motility. Based on these results, a phenotypic analysis of *E. coli* mutant strains with different levels of *c*-di-GMP was performed and revealed the existence of a mechanism for fine-tuning *c*-di-GMP levels.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains, Plasmids, Phages, and Cell Growth—All of the strains used were *E. coli* K-12 derivatives with the exception of TOB1 strain, a fecal isolate (14). The genotypes and sources of the relevant bacterial strains and plasmids are given in supplemental Table 1. Luria-Bertani broth (LB) was prepared as previously described (15). A_{600} was determined in an Ultrospec 3100 Pro Amersham Biosciences spectrophotometer. Aerobic cultures were grown at 37 °C with shaking (200 rpm) in 250-ml flasks containing 10 ml of medium. The following antibiotic concentrations were used unless otherwise noted: ampicillin (200 μ g ml⁻¹) and kanamycin (100 μ g ml⁻¹).

Cloning of *yddV* for Overexpression Experiments—Primers YddV-NcoI-5' (5'-CCC AGC CTT ATA AGG GCC ATG GTT ATG GAG ATG TAT-3') and YddV-SacI-3' (5'-CTC TGA GCT CTG GCG CAT CTA AAG ACT GGC-3') were used to PCR-amplify the whole *yddV* open reading frame to be inserted in frame into plasmid pSE420 (Invitrogen) previously cut with NcoI and SacI. Using this plasmid, the cloned *yddV* is under the regulation of the IPTG-inducible P_{lac} promoter. To verify the cloned gene, the DNA sequence of all constructs was determined at the Molecular Biology Unit of the Cellular Physiology Institute (National University of Mexico).

High Performance Liquid Chromatography—Cells were harvested at the indicated times from LB plus 1 mM IPTG cultures of strains with control vector or the expressing plasmid pYddV. Cells were extracted with 0.6 HClO₄, denatured protein was removed by centrifugation, and the supernatant was neutralized with 5 M K₂CO₃ (16, 17). The extracts were then filtered (throughout a 0.2- μ m pore size). An equivalent to 150 mg of cells (wet weight) was subjected to HPLC analysis. HPLC was performed on a 250 \times 4.6-mm LiChrosorb C-18 reversed-phase column at room temperature, detection at 252 nm on an HPLC Waters Millennium (Photo Diode Array, autosampler) apparatus. Running conditions were optimized using synthetic *c*-di-GMP as a reference. The *c*-di-GMP used as a standard was chemically synthesized in pure form by the use of a recently described novel synthesis method that produces a pure and high yield preparation of *c*-di-GMP diammonium salt (18). Before use, the purity and stability of lyophilized *c*-di-GMP were determined by first resuspending the molecule in 0.9% NaCl, creating a 2 mM solution; the results were then confirmed by HPLC analysis and electrospray ionization-time-of-flight (mass spectrometry). Cell extract HPLC runs were carried out at 1 ml min⁻¹, using a multistep gradient of acetonitrile. For the experiments on the kinetics of *c*-di-GMP synthesis (Fig. 4), samples were loaded on a 300 \times 3.9-mm Waters Bondapak® C-18 reversed-phase column.

RNA Extraction for DNA Microarray Experiments—Cultures of strains MG1655 transformed with plasmid pSE420 or pYddV were

Transcriptional Responses to High Levels of *c*-di-GMP

grown to midexponential phase on LB plus ampicillin (A_{600} = 0.3), IPTG (1 mM) was then added to the culture. After 2 h of incubation, cells were harvested by centrifugation, and total RNA was then extracted from the pellets using the hot acid phenol/chloroform method and treated with DNase I essentially as described on the World Wide Web at www.microarrays.org. Isolated RNA was quantified on the basis of its absorption at 260 nm, visualized on an agarose gel to check quality, and stored at -70 °C until further use.

Microarray Procedures and Data Analysis—For microarray analyses, cDNA was synthesized and labeled using a protocol similar to that described by Rosenow *et al.* (19). The labeled cDNA was hybridized to Affymetrix Gene Chip *E. coli* antisense genome arrays as recommended by the manufacturer (on the World Wide Web at www.affymetrix.com). Following 16 h of hybridization at 45 °C, the washing and stain of the array was automated by a GeneChip Fluidics Station controlled by Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software. For each condition, two biological replicates were done. The whole procedure was carried out at the Microarray facility of the National University of Mexico. Normalization of the data resulting from each array was performed using the Gen Arise software package (available on the World Wide Web at www.lfc.unam.mx/genarise/). The statistically significant variation of expression in response to high levels of *c*-di-GMP was obtained by filtering out those genes that had a log₂ (expression ratio) higher or lower than two S.D. values of the average.

Optical and Electron Microscopy—For optical microscopy, the samples were observed with a Nikon E-600 differential interference contrast microscope mounted with a Hamamatsu orca II camera using \times 600 magnification. All images were processed using the Wasabi 1.4.0.2 and Adobe Photoshop 7.0 programs. For transmission electron microscopy, bacterial cell suspensions were applied on Formvar-coated grids. Samples were negatively stained with 1% uranyl acetate and observed with a JEOL-1200EXII electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

Biofilm and Motility Assays—Biofilm assays were carried out at 37 °C using 96-well, non-tissue culture-treated polyvinyl chloride dishes (Costar, Cambridge, MA) or in borosilicate glass, as previously reported (20, 21). Every experiment was performed in triplicate at least three times to confirm the results. To prevent evaporation, microtiter dishes were covered with a plastic box. Visualization of attached cells was performed by removing the cell culture, staining the wells with 1.0% crystal violet for 20 min, and rinsing the wells three times with distilled water. Similar results were obtained when nondistilled water or fresh LB medium was used for rinsing. Motility assays were performed on tryptone (1.3%), NaCl (0.7%), glucose (0.2%), agar (0.3%) plates as previously described (22).

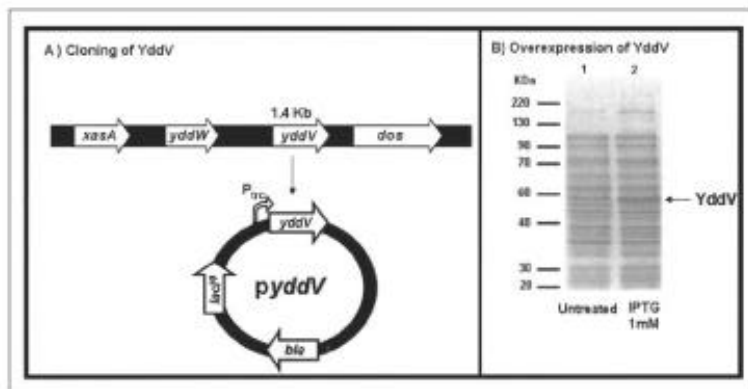
DNA Manipulation—Bacterial genomic DNA was obtained using the Genomic DNA isolation kit (Promega). Plasmid DNA was purified using the Miniprep kit (Qiagen). DNA fragments were amplified by PCR using *E. coli* chromosomal DNA as template.

Mutagenesis and Genetic Techniques— P_{lac} generalized transductions and transformations using the CaCl₂ protocol were performed as described by Miller (15). In the gene inactivation experiments, the left flanking region of *dos* (1.1 kb) was PCR-amplified using primers MM11 (5'-GAT CGG GAA TTC TAC CAA TCA CCA GCA TAT C-3') and MM12 (5'-ACG CAG GAT CCA CTG TCG CGT TAT TCA GG-3'). The right flanking region of *dos* (1.0 kb) was PCR-amplified using primers MM13 (5'-GAT TAG GAT CCC ATC CTG GCG CAT CTA AAG AC-3') and MM14 (5'-GTT CCG ACT GCA GCG CCG CAG AAA AAC TTC AG-3'). The two PCR products were gel-purified using the QIAquick kit (Qiagen), digested with the appropriate restriction enzymes, repurified, and subjected to a four-fragment ligation mixture

Transcriptional Responses to High Levels of *c*-di-GMP

FIGURE 2. Cloning and overexpression of *yddV*.

A, a 1.4-kb fragment containing the entire *yddV* structural gene was cloned into pSE420. In this construct, *yddV* is under the regulation of a P_{lac} promoter (IPTG-inducible). B, Coomassie staining of a SDS-PAGE of *E. coli* cells bearing the *yddV* plasmid. A culture of this strain was grown in LB to exponential phase ($A_{600} = 0.3$) and then split in two flasks; 1 mM IPTG was added to one culture (lane 2), and the other was left untreated (lane 1). Cultures were harvested after 2 h of treatment and subjected to SDS-PAGE. The arrow indicates the protein YddV.



with a 1.3-kb BamHI-BamHI fragment containing the kanamycin resistance gene cassette from plasmid pUC4K-K1XX (Amersham Biosciences; supplemental Table I) and plasmid pTZ19R or pUC18 digested with EcoRI and PstI. T4 DNA ligase (Invitrogen) was used under the conditions suggested by the manufacturer. After 18 h of incubation at 14 °C, the ligation mixture was used for transformation of strain XL1-blue (supplemental Table I), and selection was done on plates supplemented with ampicillin, kanamycin, and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Plasmids from white colonies were purified, and those with the correct constructs, Δ *dos*:kan, were linearized by digestion with EcoRI and used to transform strain JC7623 (supplemental Table I) to kanamycin resistance (Kan^r). This strain efficiently recombines linear DNA into its chromosome (23). $P_{1, \omega}$ lysates obtained from the selected Kan^r recombinants were used to transduce the *kan* insertions into strains MC4100 and W3110. Chromosomal insertions were confirmed by PCR and by Southern blot (24) (Fig. 7). For the construction of a double Δ *yddV*-*dos*:kan mutant, the procedure of Chaveiroche *et al.* (25) was followed using the following primers for the amplification of the adjacent sequences to the *yddV*-*dos* operon: YddV-GB-L3 (5'-GCA ATG TAA CAT CAG AGA TTT TGA GAC ACA ACG TGG CTT TCA TAA TTC ACA CCC TTA TAA GGC TGG G-3') and YddV-GB-L3B (5'-CCG GAA CTG AAA AAG CAG CTC GAT CTT AAC G-3') for the amplification of 0.5 kbp upstream from the translational start site of the *yddV*-*dos* operon and Dos-GB-L5 (5'-GCA ACA CCT TCT TCA CGA GGC AGA CCT CAG CGC CTG ACA AAT TCC TCT CGC CCG CAC TCG CGG GTT TTC-3') and Dos-GB-L5B (5'-TTG CCA CAA CAT CGC CTG TGC TTG TTG TGG GCG-3') for the amplification of 0.5 kbp downstream from the *dos* translational stop codon. The kanamycin cartridge was PCR-amplified from chromosomal DNA from strain JMH1232 (25) using Ampli-KAN-L5 (5'-GGG GGA AAG CCA CGT TGT GTC TCA A-3') and Ampli-KAN-L3 (5'-GGG GGC GCT GAG GTC TGC CTC GTG A-3'). PCR products and plasmid DNA sequencing was carried out at the DNA sequencing facility of the Biomedical Research Institute (National University of Mexico).

DNA Sequence Analyses—The GCG Wisconsin Package, NCBI BLAST (available on the World Wide Web at www.ncbi.nlm.nih.gov/80/BLAST/), and the Colibri server (available on the World Wide Web at genolist.pasteur.fr/Colibri/) facilities were used for DNA sequence analyses.

Isolation of RNA and RT-PCR Experiments—Total RNA was purified from late exponential phase cultures (RNAeasy kit Qiagen) of strain

MC4100 grown aerobically on LB medium. Pure RNA preparations were treated with Sau3AI restriction enzyme for 1 h at 37 °C, and the RNA was re-purified. cDNA was synthesized using the OMNIScript kit (Qiagen) with primers MM1 (5'-CGG GCT GAT ACC GCT GGC TTC GC-3') or MM3 (5'-CGG TTG TGA CGA ATG TAT TCA GG-3') (Fig. 6A). RT-PCR amplification was carried out using primers MM2 (5'-GAG GGG ATG AGT CGG GAG CTG C-3') and MM4 (5'-CCG CCG TTT CCT ACC GAC TAT CT-3'), as described under "Results" (Fig. 6A). RT-PCR products were analyzed in a 1% agarose TBE 1 × gel electrophoresis (Fig. 6B).

RESULTS

Identification of *yddV* as a Diguanylate Cyclase—Genomic studies have identified 19 proteins with a GGDEF domain in *E. coli* (supplemental Table IV) (9). Taking the amino acid sequence of DGC1 (diguanylate cyclase) from *G. xylinus* as template, we found that one of the closest matches (31% identical in the GGDEF domain) to this protein in *E. coli* was the product of the gene *yddV*, also named *yhcK* or *h1490* (Fig. 2A). The main difference between YddV and DGC1 is the presence of a PAS (*Drosophila* period clock protein (PER), vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), and *Drosophila* single-minded protein (SIM)) domain in DGC1 (2, 8). Interestingly, two recent reports provided biochemical and genetic evidence that YddV has diguanylate cyclase activity, since it complemented a *colR2* mutant of *Rhizobium leguminosarum* (8), and high levels of *c*-di-GMP were detected when a plasmid bearing *yddV* under the regulation of its native promoter was transformed into *Salmonella enterica* (11). Then we decided to clone *yddV* under the control of an inducible promoter (P_{lac}) in order to manipulate the intracellular *c*-di-GMP levels. *yddV* was cloned as described under "Experimental Procedures," and the DNA sequence of the cloned fragment was determined to check for any possible inserted mutations due to the PCR procedure (data not shown). As shown in Fig. 2B, an increase in the expression of YddV was evident when 1 mM IPTG was added to the medium (lane 2). We determined that maximal YddV induction (as judged by the increase in the intensity of the band corresponding to YddV on a 10% SDS-PAGE) was observed when an exponentially growing culture ($A_{600} = 0.3$) was treated with 1 mM IPTG for 2 h (data not shown). To validate an increase in *c*-di-GMP levels, we performed HPLC of the cell extracts using chemically synthesized *c*-di-GMP as a standard (see "Experimental Procedures" and Fig. 3A). As depicted in Fig. 3B, there was a clear increase of *c*-di-GMP levels in cell extracts of the *E. coli* strain overexpressing YddV. To confirm the iden-

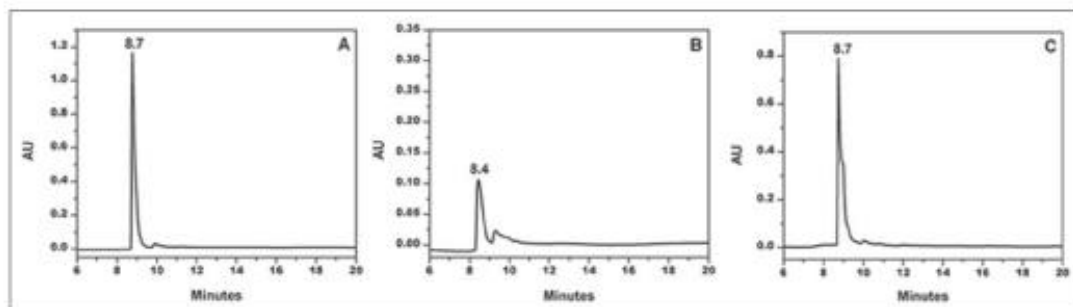


FIGURE 3. Detection and identification of *c*-di-GMP by HPLC. A, synthetic *c*-di-GMP used as a standard. B, cellular extracts of *E. coli* transformed with plasmid pYddV and treated with 1 mM IPTG for 2 h. C, a mixture of A and B. Samples were separated on reversed-phase HPLC. Extraction of nucleotides was carried out in cell extracts harvested as described for Fig. 1. See "Experimental Procedures" for details.

tity of the major peak in our sample, we mixed the cell extract with the standard, and only one peak with a retention time of 8.7 was observed (Fig. 3C). No signals were detected when cell extracts from cultures of strains harboring the control vector were used (data not shown). To analyze the kinetics of *c*-di-GMP synthesis, we performed a similar HPLC analysis using extracts from cultures of strains bearing the plasmid vector pSE420 or the pYddV construct at different given times after the induction by IPTG. As shown in Fig. 4, a progressive accumulation of *c*-di-GMP was evident at 0.5, 1, 3, and 5 h after the addition of IPTG; by contrast, no *c*-di-GMP signal was detected in extracts from the strain bearing the control vector even after 5 h of induction (Fig. 4). Taken together, these results strongly suggest that our cloned gene *yddV* is indeed a diguanylate cyclase and that the induction of the gene *yddV* provokes an increase in *c*-di-GMP intracellular levels. In order to determine the transcription profile of *E. coli* under high levels of *c*-di-GMP, we decided to extract total RNA from cultures treated with IPTG for 2 h, since they were still in the exponential phase of growth ($A_{600} = 0.7$), in contrast to cultures with 3 or 5 h of induction that were already deep into the stationary phase ($A_{600} = 1.8$ and $A_{600} = 2.1$, respectively).

Genes Whose Transcription Is Altered by High Concentrations of *c*-di-GMP—Microarray analyses were carried out on RNA samples extracted from cultures of cells carrying the control vector or the plasmid bearing the *yddV* gene under the growth conditions described above (high levels of *c*-di-GMP). Results obtained from duplicate DNA microarray analyses were normalized and filtered for those genes with statistically significant variation of the transcription levels between the control and the high *c*-di-GMP conditions (i.e. \log_2 (expression ratio) higher or lower than $2 \times$ S.D.). Of 4288 genes analyzed, 196 (4.5% of the genome) passed the filter and were further analyzed. These genes were divided into two groups, those that were induced and those that were repressed (109 and 87, respectively), and divided into functional categories based on NCBI, TIGR, and ECOCYC gene annotations and data base searches for identified homologues. The affected genes were dispersed through nearly all of the functional categories, the most striking being genes related to unknown proteins (divided into hypothetical conserved proteins, unclassified, and unknown; 35% of the total number of altered genes). The general metabolism was clearly affected; energy metabolism was the single functional category, with the highest number of genes showing significant transcriptional alteration (9%), closely followed by transport and binding proteins (8%). Genes involved in other metabolism, such as central intermediary metabolism or cellular processes, had percentages of 4 and 3%, respectively. A considerable number of genes involved in regulatory functions (4.5%) were affected, and the same was observed for biosynthesis of cofactors, prosthetic groups,

and carriers (4%) and cell envelope-related proteins (6%). It is noteworthy that 25% of the altered genes (50 genes) code for membrane-bound proteins and that 6% are genes related to virulence.

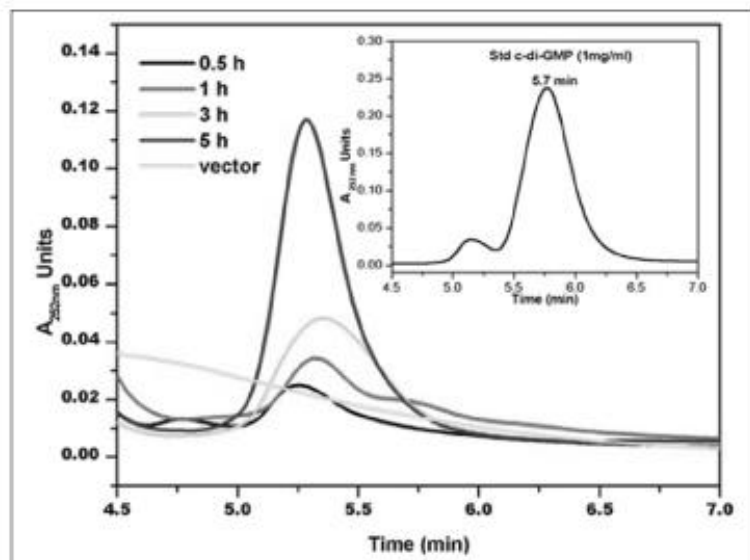
Genes Whose Transcription Is Induced by High Levels of *c*-di-GMP—Analysis of the genes induced by high *c*-di-GMP levels indicated that cell wall-modifying proteins were the highest induced under these culture conditions (supplemental Table II). Particularly interesting is the *rcsA* gene, encoding the transcriptional auxiliary protein RcsA involved in later stages of biofilm development and capsular polysaccharide synthesis (26, 27); the *acrA* gene, encoding a lipoprotein involved in cell wall biogenesis; *b2056* (*wcaD*), a gene regulated by RcsA, involved in the regulation of colanic acid production (28); and *nlpA*, encoding for a putative surface antigen. This transcriptional profile may imply a dramatic change in the properties of the cell surface as a response to high levels of *c*-di-GMP (supplemental Table II). This is consistent with previous observations in *S. enterica* and *Caulobacter crescentus* (11, 29).

Increased transcription of known transcriptional factors such as Fur may indicate on one side that genes involved in iron uptake are highly repressed; accordingly, two of the most Fur-negatively regulated genes, *gltA* and the operon including *sufA*, *sufB*, and *sufS*, are highly repressed (30) (supplemental Table III; see "Discussion"). On the other hand, the induction of SoxS, the positive transcriptional regulator of the superoxide response, may suggest a stress condition caused by the elevated levels of *c*-di-GMP. Surprisingly, SoxS-regulated genes, such as *sodA*, are not considerably up-regulated; this apparent discrepancy has already been reported (31). Very interestingly, *yajL*, *madR*, *sapR*, and *zraR*, encoding putative transcriptional regulators, are also induced; the significance of this fact remains unknown, but it is interesting to note that ZraR is involved in metal tolerance-resistant processes (32). Finally, it is noteworthy that *ftsT* (*b1570*) and *ftsX* (*b3462*), involved in cell division processes, were highly up-regulated.

Genes Whose Transcription Is Repressed under High Levels of *c*-di-GMP—Analysis of the most repressed genes under our experimental conditions revealed that genes involved in sugar metabolism were predominant; isocitrate lyase (*aceA*), citrate synthase, (*gltA*), citrate lyase (*citF*), ribokinase (*yeiC*), succinate dehydrogenase (*sdhA*), proteins of the sugar phosphotransferase system (*agaD* and *b2387*), and a putative transcriptional regulator of sugar metabolism, *ygbL*, were drastically repressed (supplemental Table III). Interestingly, several permease-related encoding genes are heavily shut down: *uhpC*, *b1688*, *b1966*, *b1683*, *bcr*, *yjiJ*, *oppB*, *yfcA*, and likewise membrane-associated protein genes (*ymgE*, *b2430*, *yhlI*, *yjba*, *gfpG*, *b1966*, *yqjA*, *b2433*, *yedP*, and *ompC*; supplemental Table III). These results indicate that the main effect triggered by the elevation of *c*-di-GMP intracellular levels is a cell

Transcriptional Responses to High Levels of *c*-di-GMP

FIGURE 4. Kinetics of *c*-di-GMP formation. *c*-di-GMP amounts were monitored by HPLC in cell extracts from cultures of strain MG1655 bearing the pYddV or the control pSE420 plasmid after the addition of 1 mM IPTG. Samples were taken at different times and subjected to HPLC analysis. For clarity, since the control experiments did not display any *c*-di-GMP signal, only the 5-h trace is shown (vector).



surface change. Intriguingly, two genes encoding cooperative transcriptional regulators, *GadX* (*yhiX*) and *GadE* (*yhiE*), are severely repressed; it is known that high expression of these genes leads to increased resistance of *E. coli* strains under high acid conditions (supplemental Table III) (33). Other transcriptional regulator-encoding genes, such as *yfiH*, *yneA*, *ygbI*, *ydeW*, and *yieP*, are also repressed. The meaning of this repression has yet to be elucidated, since the target genes and the role of these transcriptional factors are unknown. Moreover, genes involved in motility are highly repressed (*yfiP* and *hogF*; supplemental Table III).

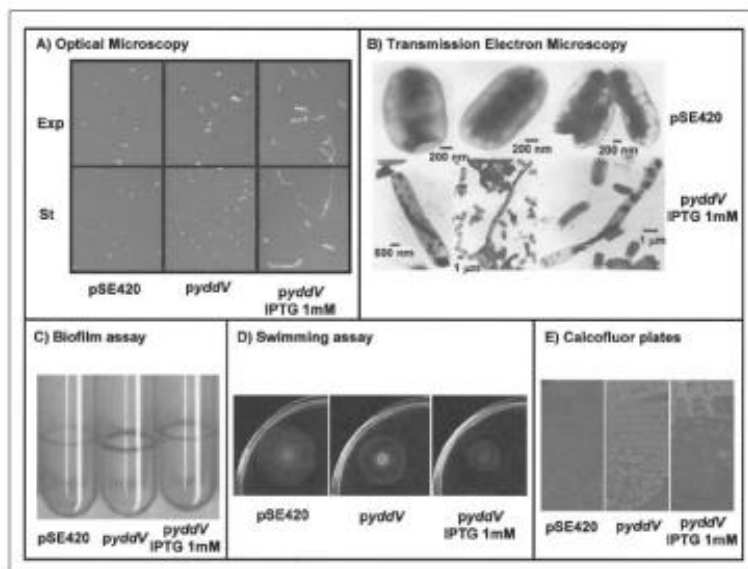
Effect of High Intracellular Levels of *c*-di-GMP in *E. coli* Physiology—In light of our genome-wide transcriptional analyses, we reasoned that processes like cell shape, motility, and cell division may be altered by an abrupt increase in the intracellular *c*-di-GMP levels. In order to test this idea, we first checked if cells with high levels of *c*-di-GMP were affected in cell morphology by performing optical microscopy. Surprisingly, cells carrying the pYddV plasmid displayed an abnormal length, either in the exponential or stationary phase of growth; this was even more evident when 1 mM IPTG was added (Fig. 5A). Apparently, cell division stopped in more than the 85% of the population, and cells started to elongate progressively. Interestingly, those elongated cells that could divide made it only at one pole, releasing a cell the size of which was the equivalent of a wild-type cell. These results suggest that an increase in *c*-di-GMP levels has a dramatic effect on cell division. To further explore this phenomenon, we carried out transmission electron microscopy with samples from cultures of the strains bearing the control vector or the pYddV plasmid, both treated with 1 mM IPTG for 2 h. As shown in Fig. 5B, cells bearing the control vector showed a normal rod shape and an average length of 1.0–1.8 μ m. By contrast, 85% of cells carrying the pYddV plasmid showed a filamentous shape and a length from 5 to 15 μ m, again, suggesting that cells with high levels of *c*-di-GMP are impaired in cell division.

Recent reports have suggested that high levels of the second messenger *c*-di-GMP in *S. enterica* serovar Typhimurium promote sessility (11) and biofilm formation (34). In order to test if a similar pattern was observed in *E. coli* when *yddV* is overexpressed, strain W3110 was

transformed with our pYddV construct, and biofilm and swimming assays were carried out (Fig. 5, C and D). It was evident that a significant increase in biofilm formation was observed in LB cultures of W3110 transformants bearing the plasmid pYddV in comparison with those transformants bearing the control vector pSE420 (Fig. 5C). When motility assays were carried out, a clear decrease in motility was observed concomitantly with the increase of *c*-di-GMP levels, suggesting that the higher the *c*-di-GMP levels, the lesser the ability to swim (Fig. 5D). Finally, taking into account that *c*-di-GMP was identified in *G. xylinus* as a second messenger involved in cellulose production, we decided to check whether or not under our experimental conditions, high levels of *c*-di-GMP resulted in higher amounts of cellulose. To test this idea, we transformed the *E. coli* strain TOB1, a fecal isolate able to produce cellulose (14) with the control vector pSE420 or the plasmid pYddV; we then streaked the transformants on calcofluor plates, an indicator of cellulose production (Fig. 5E) (14). TOB1 transformants bearing the control vector pSE420 displayed basal levels of fluorescence, indicating low cellulose production; by contrast, the sole presence of plasmid pYddV clearly enhanced cellulose production as judged by the sharp increase in fluorescence. The addition of 1 mM IPTG to the plates increases cellulose production (Fig. 5E). Taken together, these results strongly indicate that YddV is indeed a diguanylate cyclase and that elevated intracellular levels of *c*-di-GMP affect the bacterial cell physiology.

Genetic Location of *yddV*—Looking up at the *E. coli* genetic map, we realized that *yddV* is located at position 33.71 min. The genomic region of *yddV* includes the gene *dos* (*b1489*), which is located immediately downstream of *yddV* (Figs. 2A and 7; on the World Wide Web, see genolist.pasteur.fr/Colibri/). The gene *dos* has been extensively studied (see Ref. 35 and references therein), and interestingly, it encodes for the EcDos protein composed of two domains, an NH₂-terminal heme sensor-PAS-PAS-containing domain and a COOH-terminal GGDEF-EAL catalytic phosphodiesterase domain. The domain composition of the EcDos protein (PAS-PAS-GGDEF-EAL) may imply that it may work as a diguanylate cyclase (due to the presence of a GGDEF domain) as well

FIGURE 5. Effect of the overexpression of *yddV* on the *E. coli* metabolism. A, exponentially growing (Exp) or stationary phase (St) cultures of transformed strains of W3110 with the vector plasmid (left) or with the *yddV* plasmid in the absence (middle) or presence of IPTG (right) were prepared for optical microscopy. B, transmission electron microscopy was carried out on cells bearing the pSE420 control vector (top) or the *yddV* construct (bottom) in the presence of 1 mM IPTG. Different amplifications and fields are shown. C, aerobic cultures of transformed W3110 strain with the vector plasmid (first tube) or with the *yddV* plasmid in the absence or presence of IPTG were grown on LB for 24 h at 37 °C; after that, crystal violet staining (see "Experimental Procedures") was carried out to determine the amounts of biofilm formed. D, swimming assays of transformed strains of W3110 with the vector plasmid (left) or with the *yddV* plasmid in the absence (middle) or presence of 1 mM IPTG (right). E, TOB1 strains transformed with the vector plasmid (left) or with the *yddV* plasmid were streaked on calcofluor plates in the absence (two left panels) or in the presence of 1 mM IPTG (right panel). Plates were incubated at 30 °C for 48 h and were then exposed to short wave UV to check for fluorescence.



as a phosphodiesterase (due to the presence of an EAL domain). Only the phosphodiesterase activity has been reported for this protein, and a possible explanation for the presence of "inactive" GGDEF domains has been already described (7). EcDos is homologous to the PDEA1 phosphodiesterase of *A. xylosum* (50% similarity) involved in the hydrolysis of *c*-di-GMP into pGpG. To determine if *yddV* and *dos* are co-transcribed, we performed an RT-PCR analysis (see "Experimental Procedures"; Fig. 6). When primer MM1 was used for cDNA synthesis, the only possibility of having a PCR product when primers MM1 and MM4 were used for RT-PCR was that *dos* and *yddV* were encoded in the same mRNA (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, a 1.0-kb PCR product was evident (lane 3). To confirm these data, primers MM3 and MM4 were used for RT-PCR (Fig. 6A). As shown in lane 2 of Fig. 6B, a 0.7-kb PCR product was observed. When primer MM3 was used for cDNA synthesis, we observed a 0.7-kb PCR product when MM4 and MM3 primers were used for RT-PCR (lane 8), and no PCR products were amplified when the combinations MM1 + MM4 or MM1 + MM2 were used (lanes 9 and 7, respectively). Moreover, a 294-bp PCR product was observed when primers MM1 and MM2 were used for RT-PCR only when the cDNA was synthesized using primer MM1 (compare lanes 1 and 7). Negative control experiments for possible DNA contamination were carried out by running a PCR using RNA as template with primers MM1 and MM4 (lane 13), and positive control experiments were carried out by using the same primers but with chromosomal DNA as template (lane 15). Similar experiments were carried out with RNA extracted from a Δ *dos*:kan mutant strain. In all cases, no PCR products were observed (lanes 4–6, 10–12, and 14). Taken together, these results strongly suggest that *dos* and *yddV* are part of a bicistronic operon.

Characterization of Δ *yddV*:*dos*:kan and Δ *dos*:kan Mutant Strains—In order to study the contribution of both of these genes to the regulation of *c*-di-GMP intracellular levels, we constructed a Δ *dos*:kan and a Δ *yddV*:*dos*:kan mutant strains (see "Experimental Procedures" and Fig. 7). Optical microscopy of a Δ *dos*:kan culture showed elongated cells in 60% of the culture (Fig. 7C). This phenotype resembles that of high levels of *c*-di-GMP caused by overexpressing *yddV* (Fig. 5, A and B);

however, it is important to note that the size of these elongated cells was significantly shorter. On the other hand, a Δ *yddV*:*dos* deletion does not affect cell size (Fig. 7F). These results indicate that *yddV* probably contributes significantly to the *c*-di-GMP intracellular levels.

DISCUSSION

There is increasing evidence for a broader role of *c*-di-GMP in bacterial metabolism than originally anticipated when it was shown for *A. xylosum* and *S. enterica* that *c*-di-GMP levels regulate cellulose production (high levels of *c*-di-GMP increase the production of cellulose (2, 36)). A clear and elegant example of the role of *c*-di-GMP in a different bacterial process is its role as a cofactor of the protein PleD, a transcriptional regulator involved in the transition of stacked to a motile cell in *Caulobacter crescentus* (37). On the other hand, *c*-di-GMP has been associated with the transition from sessility to motility in *S. enterica* serovar Typhimurium (11) and with the process of biofilm formation in *Yersinia pestis* (38) and *Staphylococcus aureus* (39). Genetic studies had predicted that GGDEF domains are DGC and that the EAL domains should harbor the *c*-di-GMP-specific PDE activity. Apparently, GGDEF domains are a bacterial trait, since they are absent in Archaea and Eukarya. Despite a great effort to elucidate the role of *c*-di-GMP in bacterial metabolism, limited information is available on the activities and possible targets of *c*-di-GMP and on the specific biochemical properties of enzymes involved in synthesis and hydrolysis of *c*-di-GMP.

The present work had the goal of studying the genome-wide transcriptional profile of *E. coli* under a growth condition with high levels of *c*-di-GMP. The information provided by this transcriptional profile would allow us to explain some of the phenotypes in which *c*-di-GMP has been involved as well as to possibly identify transcriptional regulators responding to this second messenger. High levels of *c*-di-GMP have been associated with increased biofilm formation (34); this was in line with our findings, since several genes involved in exopolysaccharide synthesis and membrane-associated genes are heavily induced (supplemental Table II); on the other hand, we could confirm that high levels of *c*-di-GMP result in higher biofilm formation (Fig. 5).

Transcriptional Responses to High Levels of c-di-GMP

FIGURE 6. RT-PCR analysis of the *dos* gene. A, diagram showing the RT-PCR strategy. cDNA was synthesized with primer MM1 or MM3. Primers MM4 and MM2 were used for RT-PCR. The expected sizes of the PCR-generated fragments are indicated below the primers. B, gel electrophoresis of the RT-PCR products generated using RNA from cells grown aerobically at 37 °C. Lanes 7–9, PCR products from cDNA generated with primer MM1. Lanes 7–12, PCR products from cDNA generated using primer MM3. RNA from MC4100 (wild type (wt)) strain (lanes 7–3 and 7–9) and from a Δ *dos*kan mutant (lanes 4–6 and 10–12) were used. Control experiments were carried out using RNA from the wild type (lane 13) and Δ *dos*kan mutant strains (lane 14) and chromosomal DNA from the wild type strain (lane 15) for PCR amplification. Lane 16, 1-kb ladder. Pairs of primers used for PCR are indicated by a plus sign.

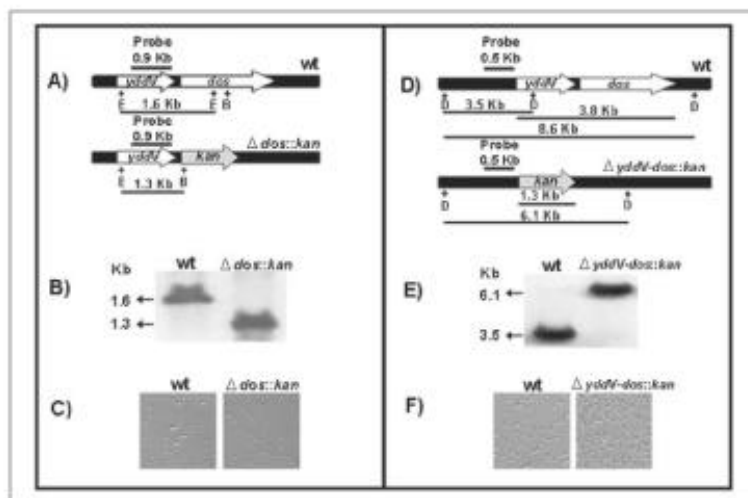
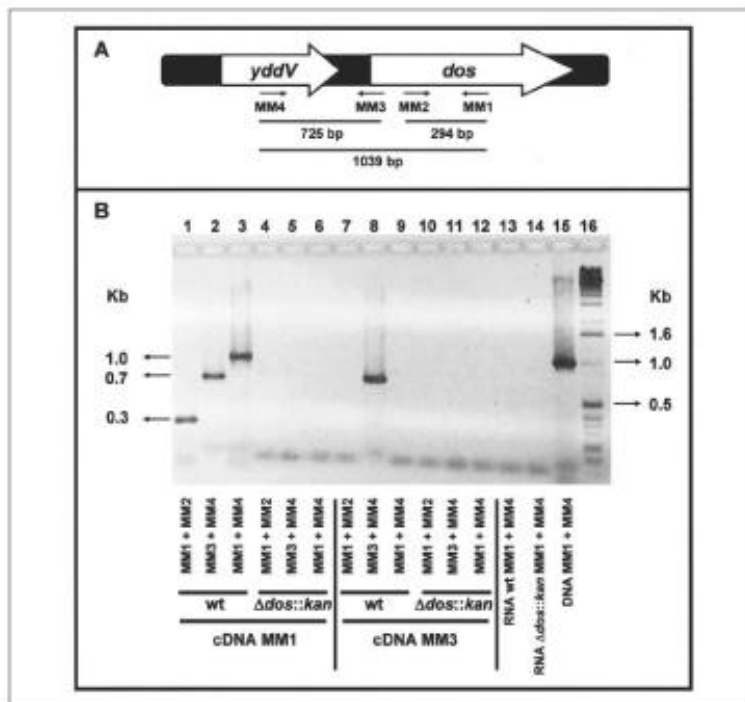


FIGURE 7. Construction of Δ *dos*kan or Δ *yddV-dos*kan mutant strains and effect of the mutations on cell shape. A and D, diagram showing the *yddV-dos* chromosomal region. The arrows indicate the *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), or *Dra*I (D) restriction sites of the W3110 strain and the Δ *dos*kan or Δ *yddV-dos*kan mutant strains. B and E, Southern blot analysis of chromosomal DNA extracted from wild type (W3110), a Δ *dos*kan, or a Δ *yddV-dos*kan mutant strain digested with *Eco*RI and *Bam*HI (for the *dos* mutant) or *Dra*I (for the Δ *yddV-dos* mutant). The 0.9- or 0.5-kb probes used are depicted as well as the expected sizes of the fragments (A, C and F). Optical microscopy of cultures of the wild-type (W3110), Δ *dos*kan, and Δ *yddV-dos*kan mutant strains. wt, wild type.

Very interestingly, one of the most induced genes is *rcsA* (30.7-fold), coding for a transcriptional activator (RcsA), which is part of a complex phosphorelay that also includes the proteins RcsB, RcsC, and RcsD. The phosphate travels from the histidine kinase domain in RcsC to a response regulator domain in the same protein; from there to a phosphotransfer protein, RcsD; and from there to the response regulator RcsB, which in conjunction with the unstable regulatory protein RcsA,

is required for capsule synthesis. Consistently, most of the genes involved in this process are induced under our experimental conditions (*wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *wcaG*, *wcaH*, *wcaI*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wcaM*, *wcaN*, *wcaO*, *wcaP*, *wcaQ*, *wcaR*, *wcaS*, *wcaT*, *wcaU*, *wcaV*, *wcaW*, *wcaX*, *wcaY*, *wcaZ*, *wcaAA*, *wcaAB*, *wcaAC*, *wcaAD*, *wcaAE*, *wcaAF*, *wcaAG*, *wcaAH*, *wcaAI*, *wcaAJ*, *wcaAK*, *wcaAL*, *wcaAM*, *wcaAN*, *wcaAO*, *wcaAP*, *wcaAQ*, *wcaAR*, *wcaAS*, *wcaAT*, *wcaAU*, *wcaAV*, *wcaAW*, *wcaAX*, *wcaAY*, *wcaAZ*, *wcaBA*, *wcaBB*, *wcaBC*, *wcaBD*, *wcaBE*, *wcaBF*, *wcaBG*, *wcaBH*, *wcaBI*, *wcaBJ*, *wcaBK*, *wcaBL*, *wcaBM*, *wcaBN*, *wcaBO*, *wcaBP*, *wcaBQ*, *wcaBR*, *wcaBS*, *wcaBT*, *wcaBU*, *wcaBV*, *wcaBW*, *wcaBX*, *wcaBY*, *wcaBZ*, *wcaCA*, *wcaCB*, *wcaCC*, *wcaCD*, *wcaCE*, *wcaCF*, *wcaCG*, *wcaCH*, *wcaCI*, *wcaCJ*, *wcaCK*, *wcaCL*, *wcaCM*, *wcaCN*, *wcaCO*, *wcaCP*, *wcaCQ*, *wcaCR*, *wcaCS*, *wcaCT*, *wcaCU*, *wcaCV*, *wcaCW*, *wcaCX*, *wcaCY*, *wcaCZ*, *wcaDA*, *wcaDB*, *wcaDC*, *wcaDD*, *wcaDE*, *wcaDF*, *wcaDG*, *wcaDH*, *wcaDI*, *wcaDJ*, *wcaDK*, *wcaDL*, *wcaDM*, *wcaDN*, *wcaDO*, *wcaDP*, *wcaDQ*, *wcaDR*, *wcaDS*, *wcaDT*, *wcaDU*, *wcaDV*, *wcaDW*, *wcaDX*, *wcaDY*, *wcaDZ*, *wcaEA*, *wcaEB*, *wcaEC*, *wcaED*, *wcaEE*, *wcaEF*, *wcaEG*, *wcaEH*, *wcaEI*, *wcaEJ*, *wcaEK*, *wcaEL*, *wcaEM*, *wcaEN*, *wcaEO*, *wcaEP*, *wcaEQ*, *wcaER*, *wcaES*, *wcaET*, *wcaEU*, *wcaEV*, *wcaEW*, *wcaEX*, *wcaEY*, *wcaEZ*, *wcaFA*, *wcaFB*, *wcaFC*, *wcaFD*, *wcaFE*, *wcaFF*, *wcaFG*, *wcaFH*, *wcaFI*, *wcaFJ*, *wcaFK*, *wcaFL*, *wcaFM*, *wcaFN*, *wcaFO*, *wcaFP*, *wcaFQ*, *wcaFR*, *wcaFS*, *wcaFT*, *wcaFU*, *wcaFV*, *wcaFW*, *wcaFX*, *wcaFY*, *wcaFZ*, *wcaGA*, *wcaGB*, *wcaGC*, *wcaGD*, *wcaGE*, *wcaGF*, *wcaGG*, *wcaGH*, *wcaGI*, *wcaGJ*, *wcaGK*, *wcaGL*, *wcaGM*, *wcaGN*, *wcaGO*, *wcaGP*, *wcaGQ*, *wcaGR*, *wcaGS*, *wcaGT*, *wcaGU*, *wcaGV*, *wcaGW*, *wcaGX*, *wcaGY*, *wcaGZ*, *wcaHA*, *wcaHB*, *wcaHC*, *wcaHD*, *wcaHE*, *wcaHF*, *wcaHG*, *wcaHH*, *wcaHI*, *wcaHJ*, *wcaHK*, *wcaHL*, *wcaHM*, *wcaHN*, *wcaHO*, *wcaHP*, *wcaHQ*, *wcaHR*, *wcaHS*, *wcaHT*, *wcaHU*, *wcaHV*, *wcaHW*, *wcaHX*, *wcaHY*, *wcaHZ*, *wcaIA*, *wcaIB*, *wcaIC*, *wcaID*, *wcaIE*, *wcaIF*, *wcaIG*, *wcaIH*, *wcaII*, *wcaIJ*, *wcaIK*, *wcaIL*, *wcaIM*, *wcaIN*, *wcaIO*, *wcaIP*, *wcaIQ*, *wcaIR*, *wcaIS*, *wcaIT*, *wcaIU*, *wcaIV*, *wcaIW*, *wcaIX*, *wcaIY*, *wcaIZ*, *wcaJA*, *wcaJB*, *wcaJC*, *wcaJD*, *wcaJE*, *wcaJF*, *wcaJG*, *wcaJH*, *wcaJI*, *wcaJJ*, *wcaJK*, *wcaJL*, *wcaJM*, *wcaJN*, *wcaJO*, *wcaJP*, *wcaJQ*, *wcaJR*, *wcaJS*, *wcaJT*, *wcaJU*, *wcaJV*, *wcaJW*, *wcaJX*, *wcaJY*, *wcaJZ*, *wcaKA*, *wcaKB*, *wcaKC*, *wcaKD*, *wcaKE*, *wcaKF*, *wcaKG*, *wcaKH*, *wcaKI*, *wcaKJ*, *wcaKL*, *wcaKM*, *wcaKN*, *wcaKO*, *wcaKP*, *wcaKQ*, *wcaKR*, *wcaKS*, *wcaKT*, *wcaKU*, *wcaKV*, *wcaKW*, *wcaKX*, *wcaKY*, *wcaKZ*, *wcaLA*, *wcaLB*, *wcaLC*, *wcaLD*, *wcaLE*, *wcaLF*, *wcaLG*, *wcaLH*, *wcaLI*, *wcaLJ*, *wcaLK*, *wcaLL*, *wcaLM*, *wcaLN*, *wcaLO*, *wcaLP*, *wcaLQ*, *wcaLR*, *wcaLS*, *wcaLT*, *wcaLU*, *wcaLV*, *wcaLW*, *wcaLX*, *wcaLY*, *wcaLZ*, *wcaMA*, *wcaMB*, *wcaMC*, *wcaMD*, *wcaME*, *wcaMF*, *wcaMG*, *wcaMH*, *wcaMI*, *wcaMJ*, *wcaMK*, *wcaML*, *wcaMM*, *wcaMN*, *wcaMO*, *wcaMP*, *wcaMQ*, *wcaMR*, *wcaMS*, *wcaMT*, *wcaMU*, *wcaMV*, *wcaMW*, *wcaMX*, *wcaMY*, *wcaMZ*, *wcaNA*, *wcaNB*, *wcaNC*, *wcaND*, *wcaNE*, *wcaNF*, *wcaNG*, *wcaNH*, *wcaNI*, *wcaNJ*, *wcaNK*, *wcaNL*, *wcaNM*, *wcaNN*, *wcaNO*, *wcaNP*, *wcaNQ*, *wcaNR*, *wcaNS*, *wcaNT*, *wcaNU*, *wcaNV*, *wcaNW*, *wcaNX*, *wcaNY*, *wcaNZ*, *wcaOA*, *wcaOB*, *wcaOC*, *wcaOD*, *wcaOE*, *wcaOF*, *wcaOG*, *wcaOH*, *wcaOI*, *wcaOJ*, *wcaOK*, *wcaOL*, *wcaOM*, *wcaON*, *wcaOO*, *wcaOP*, *wcaOQ*, *wcaOR*, *wcaOS*, *wcaOT*, *wcaOU*, *wcaOV*, *wcaOW*, *wcaOX*, *wcaOY*, *wcaOZ*, *wcaPA*, *wcaPB*, *wcaPC*, *wcaPD*, *wcaPE*, *wcaPF*, *wcaPG*, *wcaPH*, *wcaPI*, *wcaPJ*, *wcaPK*, *wcaPL*, *wcaPM*, *wcaPN*, *wcaPO*, *wcaPP*, *wcaPQ*, *wcaPR*, *wcaPS*, *wcaPT*, *wcaPU*, *wcaPV*, *wcaPW*, *wcaPX*, *wcaPY*, *wcaPZ*, *wcaQA*, *wcaQB*, *wcaQC*, *wcaQD*, *wcaQE*, *wcaQF*, *wcaQG*, *wcaQH*, *wcaQI*, *wcaQJ*, *wcaQK*, *wcaQL*, *wcaQM*, *wcaQN*, *wcaQO*, *wcaQP*, *wcaQQ*, *wcaQR*, *wcaQS*, *wcaQT*, *wcaQU*, *wcaQV*, *wcaQW*, *wcaQX*, *wcaQY*, *wcaQZ*, *wcaRA*, *wcaRB*, *wcaRC*, *wcaRD*, *wcaRE*, *wcaRF*, *wcaRG*, *wcaRH*, *wcaRI*, *wcaRJ*, *wcaRK*, *wcaRL*, *wcaRM*, *wcaRN*, *wcaRO*, *wcaRP*, *wcaRQ*, *wcaRR*, *wcaRS*, *wcaRT*, *wcaRU*, *wcaRV*, *wcaRW*, *wcaRX*, *wcaRY*, *wcaRZ*, *wcaSA*, *wcaSB*, *wcaSC*, *wcaSD*, *wcaSE*, *wcaSF*, *wcaSG*, *wcaSH*, *wcaSI*, *wcaSJ*, *wcaSK*, *wcaSL*, *wcaSM*, *wcaSN*, *wcaSO*, *wcaSP*, *wcaSQ*, *wcaSR*, *wcaSS*, *wcaST*, *wcaSU*, *wcaSV*, *wcaSW*, *wcaSX*, *wcaSY*, *wcaSZ*, *wcaTA*, *wcaTB*, *wcaTC*, *wcaTD*, *wcaTE*, *wcaTF*, *wcaTG*, *wcaTH*, *wcaTI*, *wcaTJ*, *wcaTK*, *wcaTL*, *wcaTM*, *wcaTN*, *wcaTO*, *wcaTP*, *wcaTQ*, *wcaTR*, *wcaTS*, *wcaTT*, *wcaTU*, *wcaTV*, *wcaTW*, *wcaTX*, *wcaTY*, *wcaTZ*, *wcaUA*, *wcaUB*, *wcaUC*, *wcaUD*, *wcaUE*, *wcaUF*, *wcaUG*, *wcaUH*, *wcaUI*, *wcaUJ*, *wcaUK*, *wcaUL*, *wcaUM*, *wcaUN*, *wcaUO*, *wcaUP*, *wcaUQ*, *wcaUR*, *wcaUS*, *wcaUT*, *wcaUU*, *wcaUV*, *wcaUW*, *wcaUX*, *wcaUY*, *wcaUZ*, *wcaVA*, *wcaVB*, *wcaVC*, *wcaVD*, *wcaVE*, *wcaVF*, *wcaVG*, *wcaVH*, *wcaVI*, *wcaVJ*, *wcaVK*, *wcaVL*, *wcaVM*, *wcaVN*, *wcaVO*, *wcaVP*, *wcaVQ*, *wcaVR*, *wcaVS*, *wcaVT*, *wcaVU*, *wcaVV*, *wcaVW*, *wcaVX*, *wcaVY*, *wcaVZ*, *wcaWA*, *wcaWB*, *wcaWC*, *wcaWD*, *wcaWE*, *wcaWF*, *wcaWG*, *wcaWH*, *wcaWI*, *wcaWJ*, *wcaWK*, *wcaWL*, *wcaWM*, *wcaWN*, *wcaWO*, *wcaWP*, *wcaWQ*, *wcaWR*, *wcaWS*, *wcaWT*, *wcaWU*, *wcaWV*, *wcaWW*, *wcaWX*, *wcaWY*, *wcaWZ*, *wcaXA*, *wcaXB*, *wcaXC*, *wcaXD*, *wcaXE*, *wcaXF*, *wcaXG*, *wcaXH*, *wcaXI*, *wcaXJ*, *wcaXK*, *wcaXL*, *wcaXM*, *wcaXN*, *wcaXO*, *wcaXP*, *wcaXQ*, *wcaXR*, *wcaXS*, *wcaXT*, *wcaXU*, *wcaXV*, *wcaXW*, *wcaXX*, *wcaXY*, *wcaXZ*, *wcaYA*, *wcaYB*, *wcaYC*, *wcaYD*, *wcaYE*, *wcaYF*, *wcaYG*, *wcaYH*, *wcaYI*, *wcaYJ*, *wcaYK*, *wcaYL*, *wcaYM*, *wcaYN*, *wcaYO*, *wcaYP*, *wcaYQ*, *wcaYR*, *wcaYS*, *wcaYT*, *wcaYU*, *wcaYV*, *wcaYW*, *wcaYX*, *wcaYY*, *wcaYZ*, *wcaZA*, *wcaZB*, *wcaZC*, *wcaZD*, *wcaZE*, *wcaZF*, *wcaZG*, *wcaZH*, *wcaZI*, *wcaZJ*, *wcaZK*, *wcaZL*, *wcaZM*, *wcaZN*, *wcaZO*, *wcaZP*, *wcaZQ*, *wcaZR*, *wcaZS*, *wcaZT*, *wcaZU*, *wcaZV*, *wcaZW*, *wcaZX*, *wcaZY*, *wcaZZ*.

Transcriptional Responses to High Levels of c-di-GMP

TABLE 1
Genes regulated by SoxS, Fur, and RyhB and their responses to high levels of c-di-GMP
Genes regulated by Fur and RyhB are underlined.

Gene type	SoxS-regulated genes			Fur-regulated genes			RyhB-regulated genes		
	Gene	Regulation by SoxS ^a	Fold change in high levels of c-di-GMP ^b	Gene	Regulation by Fur ^c	Fold change in high levels of c-di-GMP	Gene	Regulation by RyhB ^d	Fold change in high levels of c-di-GMP
Induced by c-di-GMP	<i>fur</i>	+	25.63	<i>tdcD</i>	+	20.1	<i>kgpP</i>	+	3.82
	<i>acrA</i>	+	5.56	<i>cxpB</i>	+	7.35	<i>hybF</i>	+	2.47
	<i>ggxX</i>	+	4.84	<i>gsoC</i>	+	5.58	<i>nosC</i>	-	5.58
	<i>fumC</i>	+	3.19	<i>tdcF</i>	+	4.54	<i>frdA</i>	-	2.25
	<i>mlaA</i>	+	3.05	<i>acvB</i>	+	3.73	<i>nosL</i>	-	2.13
	<i>fpr</i>	+	2.38	<i>narW</i>	+	3.05	<i>ydhD</i>	-	2.04
	<i>acoA</i>	+	1.82	<i>frdA</i>	+	2.25	<i>acoA</i>	-	1.82
	<i>flhB</i>	+	1.58	<i>yhdD</i>	+	2.23	<i>bfr</i>	-	1.29
	<i>psqB</i>	+	1.49	<i>nosL</i>	+	2.13	<i>frdB</i>	-	1.08
	<i>narA</i>	+	1.44	<i>acoA</i>	+	1.82	<i>fumA</i>	-	1.06
	<i>inaA</i>	+	1.43	<i>bfr</i>	+	1.29			
	<i>zwf</i>	+	1.25	<i>frdB</i>	+	1.08			
	<i>pgpA</i>	+	1.12	<i>fumA</i>	+	1.06			
	<i>soxS</i>	-	4.55	<i>ontA</i>	-	5.06			
	<i>ompF</i>	-	1.19	<i>foxB</i>	-	3.58			
				<i>sufE</i>	-	1.78			
				<i>flaF</i>	-	1.50			
			<i>sufD</i>	-	1.22				
Repressed by c-di-GMP	<i>ngf</i>	+	-1.12	<i>sufB</i>	+	-1.18	<i>appC</i>	+	-2.77
	<i>sodA</i>	+	-1.15	<i>flaA</i>	+	-1.32	<i>appA</i>	+	-3.37
	<i>flaA</i>	+	-1.67	<i>frdD</i>	+	-1.38	<i>appB</i>	+	-4.97
	<i>nba</i>	+	-2.08	<i>sufD</i>	+	-1.41	<i>sodB</i>	-	-1.18
				<i>frdC</i>	+	-1.47	<i>flaA</i>	-	-1.32
				<i>sufA</i>	+	-1.92	<i>acoB</i>	-	-1.37
				<i>sufC</i>	+	-2.06	<i>frdD</i>	-	-1.38
				<i>acvD</i>	+	-2.13	<i>sufD</i>	-	-1.41
				<i>fecA</i>	+	-2.15	<i>frdC</i>	-	-1.47
				<i>fecD</i>	+	-2.67	<i>sufA</i>	-	-1.92
				<i>pggI</i>	+	-3.08	<i>nosF</i>	-	-2.05
				<i>ctrA</i>	+	-3.10	<i>sufC</i>	-	-2.06
				<i>gntH</i>	+	-3.38	<i>pepB</i>	-	-3.01
				<i>ycsN</i>	+	-3.58	<i>gggG</i>	-	-3.16
				<i>comA</i>	+	-4.05	<i>nosB</i>	-	-4.45
				<i>gsoB</i>	+	-4.45			
				<i>gltA</i>	+	-8.74			
				<i>sufC</i>	-	-1.20			
				<i>flaB</i>	-	-2.21			
				<i>flaC</i>	-	-3.00			
				<i>cxpF</i>	-	-3.15			
				<i>flaD</i>	-	-3.2			
				<i>nfbB</i>	-	-3.59			
				<i>ntrC</i>	-	-1.87			
				<i>sufB</i>	-	-6.30			
				<i>sufA</i>	-	-8.25			
				<i>sufS</i>	-	-8.26			

^a Data taken from Ref. 31.

^b Data obtained from this work.

^c Data taken from Ref. 30.

^d Data taken from Ref. 42.

gene involved in phospholipid synthesis and in the gene *wcaD* coding for a colanic acid polymerase (supplemental Table II). Then a clear change in cell surface properties is occurring, and this may be involved in higher biofilm formation (26) (Fig. 5C).

Another result involving the Rcs system in the response to high levels of c-di-GMP was the fact that two genes, *flhD* and *flhC*, that are negatively regulated by the RcsA/RcsB complex, are also repressed under the experimental conditions tested. About 50 genes are involved in flagellum synthesis, motility, and chemotaxis in *E. coli*. They are expressed in a hierarchical manner and have been organized into three classes according to the level in the hierarchy at which they are expressed (40). At the lowest level, class III contains the flagellin-encoding gene *flhC* and the gene involved in chemotaxis. Class II contains the σ^F factor-encoding gene *flhA*, required for the expression of the genes of class III, the anti- σ^F protein-encoding gene *flgM*, and the genes required for the synthesis of the flagellum basal body. Only two genes, *flhD* and *flhC*,

organized into an operon, define class I. They code for a transcriptional activator required for the expression of genes of class II. Thus, activation of the entire set of motility and chemotaxis genes depends on the expression of the master operon *flhDC*. Therefore, the decrease in the expression of this operon by high levels of c-di-GMP may explain our observations of a decreasing motility concomitantly with an increase in *yadV* expression (Fig. 5D). To further support this point, *flhC* and *flgM* (class III) and *flhA* (class II) are both down-regulated by RcsA/RcsB (41) and by high levels of c-di-GMP (-1.32, -2.97, and -1.53, respectively) (this work). More studies on the role of c-di-GMP in the RcsA regulatory network are necessary to understand this phenomenon.

Intriguingly, high levels of c-di-GMP triggered the transcription of more than 50 genes of unknown function. On the other hand, it is important to note that the transcription of 27 genes encoding membrane-associated proteins is dramatically decreased. This clearly suggests a change in cell shape; consistently, cells overexpressing *yadV* are

Transcriptional Responses to High Levels of c-di-GMP

elongated in shape and apparently are affected in cell division processes; notably, genes involved in cell division such as *ftsZ* and *ftsX* are altered under this condition. The transcription of 10 genes encoding transcriptional regulators was clearly diminished; in particular, two cooperative regulators, GadE (*yhiE*) and GadX (*yhiX*), are apparently shut down. Overexpression of *yhiE*, similarly to overexpression of *yhiX*, a known regulator of glutamate decarboxylase expression, leads to increased resistance of *E. coli* strains under high acid conditions, suggesting that YhiE is a regulator of gene expression in the acid response (33). The significance of the decrease in the transcriptional activity of both genes upon exposure to high levels of c-di-GMP warrants further investigation.

The *fur* gene, encoding the transcriptional repressor Fur, is highly induced, implying a repression of the iron uptake system; accordingly, genes involved in iron uptake, such as the *suf*, *nik*, and *nir* operons as well as *gltA* are repressed (Table 1). Recently, genomic studies have reported several genes that are up-regulated by Fur; this complex regulation requires the Fur-dependent repression of *ryhB*, a small RNA that in conjunction with Hfq and RNaseE decreases the expression of several genes (42). Our results are highly consistent with these observations. Fur is induced 25.6-fold by high levels of c-di-GMP, probably through the SoxRS system, since *saxS* and *saxR* are induced 4.5- and 1.74-fold, respectively. Fur then should down-regulate *ryhB* (not present in the microarray slides, since it is found inside the intergenic region between the *yhiX* and *yhiY* open reading frames), and those genes down-regulated by RyhB should then be induced. This is the case for *mioC*, *fraA*, *fraB*, *acnA*, *bfr*, and *fumA* (Table 1). Other operons belonging to this class, such as *sdhABCD*, *sodB*, *fnaA*, *fndC*, *fndD*, *nuoB*, and *oppABC*, displayed a clear decrease in transcription under high levels of c-di-GMP, suggesting that the sole induction of *fur* (and in turn the decrease of *ryhB*) is not sufficient to increase their expression; therefore, other transcriptional factors may be involved in their regulation. Moreover, a high number of permeases and sugar transporters are also shut down. Even a putative transcriptional regulator (*ydeW*) is repressed (supplemental Table III). At this point, we do not understand the significance of this fact, but it may be interesting to identify whether or not c-di-GMP interacts physically as cofactor of a transcriptional regulator as it does with PleD in *C. crescentus* (29). The identification of such a regulator would allow us to establish a mechanism of global regulation depending on the availability of c-di-GMP. It is noteworthy that only two genes encoding for GGDEF-containing domains are affected by the high levels of c-di-GMP, namely *ydaM* (repressed) and *ydaJ* (induced) (supplemental Table IV). We reasoned that under the conditions here tested, probably the transcription of a c-di-GMP phosphodiesterase (an EAL domain-bearing protein) would be enhanced. This surprising negative result led us to study the immediate downstream gene identified as *dos* encoding a PAS-PAS-GGDEF-EAL EcDos protein with a c-di-GMP phosphodiesterase activity (7, 43). Despite the fact that the EcDos protein harbors a GGDEF domain, a potential diguanylate cyclase, apparently it is inactive, and only the EAL domain, with phosphodiesterase activity, is functional. The presence of proteins with one or both domains has been extensively described, and the possibility of GGDEF "inactive" domains has been proposed (12). The arrangement of *dos* with *ydaV* suggested that they were part of an operon. Our RT-PCR analysis confirmed this and also provided evidence that *dos* is not transcribed as an independent transcriptional unit (Fig. 6). Very interestingly, in *E. coli*, there are 19 proteins with a GGDEF domain, 18 with an EAL domain, and 11 bearing domains, suggesting the possibility that the lack of one can be compensated by the other (44) (supplemental Table IV). In *A. xylosum*, the cellular levels of c-di-GMP are regulated by the

opposite activities of DGC1 (c-di-GMP synthase) and PDEA1 (c-di-GMP phosphodiesterase); however, oxygen is the master regulator, because PDEA1 activity is dependent on the redox status of its heme-based PAS domain (35, 43). Therefore, *A. xylosum* produces cellulose only under aerobic growth conditions (45). The genetic arrangement here described for *ydaV* and *dos* may suggest that in *E. coli* a similar key role is played by the oxygen, since the phosphodiesterase activity of EcDos is lost upon exposure to oxygen (35, 43). Studies are in progress to establish the role of c-di-GMP under other environmental conditions such as anoxic growth conditions. This study has revealed that, despite previous work, there is still a great deal to be discovered concerning c-di-GMP metabolism in *E. coli* K-12.

Acknowledgments—We are grateful to Luis Delgado-Olivares for technical assistance and to Miguel Páez-Silva for preparing culture media. We are grateful to Dr. Jorge Ramírez-Salcedo, José L. Santillán-Torres, Simón Guzmán-León, and Lorena Chávez-González from the Microarray Unit of the National University of Mexico. Special thanks are given to Drs. C. Beloin, J. M. Ghigo, and U. Römling for strains used in this study and to Drs. M. Girard, M. Soberón, J. Martínez, L. Camarena, E. Escamilla, and M. Contreras for useful scientific advice.

REFERENCES

1. Jenal, U. (2004) *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 185–191
2. Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1991) *Microbiol. Rev.* 55, 35–58
3. Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggan, Y., and Benziman, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18933–18943
4. Amikam, D., and Benziman, M. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 6649–6655
5. Römling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M. (2005) *Mol. Microbiol.* 57, 629–639
6. Tamayo, R., Tischler, A., and Camilli, A. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 33324–33330
7. Schmidt, A., Ryjenkov, D., and Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 4774–4781
8. Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Lindberg, M. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 163–167
9. Galperin, M., Nikolskaya, N., and Koonin, E. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 203, 11–21
10. Ryjenkov, D., Tarutina, M., Moskvina, O., and Gomelsky, M. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 1792–1798
11. Simm, R., Moer, M., Kader, A., Nirtz, M., and Römling, U. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 1123–1134
12. Christen, M., Christen, B., Fölsch, M., Schauer, A., and Jenal, U. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30829–30837
13. Galperin, M. (2004) *Environ. Microbiol.* 6, 552–567
14. Zoga, X., Nirtz, M., Rohde, M., Bokman, W., and Römling, U. (2003) *Mol. Microbiol.* 39, 1452–1463
15. Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
16. Amikam, D., Steinberger, O., Shkolnik, T., and Ben-Ishai, Z. (1995) *Biochem. J.* 311, 921–927
17. Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P., and Benziman, M. (1997) *FEBS Lett.* 416, 207–211
18. Hayakawa, Y., Nagata, R., Hirata, A., Hyodo, M., and Kawai, R. (2003) *Tetrahedron* 59, 6465–6471
19. Rossmore, C., Saxena, B. M., Duest, M., and Gingras, T. R. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, E112
20. O'Toole, G., Pratt, L., Watnick, P., Newman, D., Weaver, V., and Köhler, R. (1999) *Methods Enzymol.* 310, 91–109
21. Corona-Iquintero, F., and Mombello-Hernández, J. (2002) *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 105–110
22. Tokuda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 440–450
23. Winans, S., Ebdely, S., Krueger, J., and Walker, G. C. (1985) *J. Bacteriol.* 161, 1219–1221
24. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
25. Chaveroche, M., Ghigo, J., and d'Erfort, C. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, D97
26. Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005) *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 379–405
27. Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., and Gottesman, S. (2005) *J. Bacteriol.* 187, 6770–6778
28. Weiland, M., and Bernhard, F. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 7013–7020
29. Paul, R., Weiser, S., Amick, N., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) *Gen. Dis.* 18, 715–727

Transcriptional Responses to High Levels of *c-di-GMP*

30. McHugh, J., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Srivastava, D., Pook, B. K., Cooper, C., and Andrews, S. C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 29478–29486
31. Pompeiella, P., Bennik, M., and Dempfle, B. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 3890–3902
32. Loshartzberger, S., Huber, A., Lottspeich, F., and Bock, A. (2001) *J. Mol. Biol.* **307**, 93–105
33. Hommais, F., Kria, E., Coppes, J., Lacroix, C., Yernool, E., Danchin, A., and Berlin, F. (2004) *Microbiology* **150**, 61–72
34. Solano, C., Garcia, B., Valle, I., Berasain, C., Ghigo, J., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 793–808
35. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 23821–23827
36. D'Angenio, D., and Miller, S. (2004) *Microbiology* **150**, 2497–2502
37. Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N., Giese, B., Jonat, U., and Schirmer, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17084–17089
38. Kirilina, O., Fotherston, J., Bobrov, A., Abney, J., and Perry, R. (2004) *Mol. Microbiol.* **54**, 75–88
39. Karalis, D., Rashid, M., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M., and Hayskora, Y. (2005) *Antisense Res. Chemother.* **49**, 1029–1038
40. Chilton, G. S., and Hughes, K. T. (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 694–708
41. Francoz-Charlot, A., Langol, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wilmowski, F., Castanié-Cornat, M. P., Gutierrez, C., and Cam, K. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 823–832
42. Massé, E., and Gottesman, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4620–4625
43. Delgado-Nixon, V., Gostakow, G., and Gilles-Gonzalez, M. (2000) *Biochemistry* **39**, 2685–2691
44. Garcia, B., Lataza, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C., and Lasa, I. (2004) *Mol. Microbiol.* **54**, 264–277
45. Tai, F., Wong, H., Calhoun, B., Gilland, D., Fear, A., Volman, G., Mayer, B., Ross, F., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., and Ben-Ziman, M. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 4416–4425

Supplementary Material. Méndez-Ortiz *et al.*,

TABLE I. STRAINS, PLASMIDS AND PHAGES USED IN THIS WORK

<i>E. coli</i> strains	Relevant genotype	Source or Reference
JC7623	F ⁻ <i>recB21 recC22 sbcB15 sbC201 argE3 thi-1 thr-1 leu-6 proA2 his-4 ara14 strA</i>	(1)
JMH0476	JC7623 but <i>dos::kan</i>	This work
JMH0478	MC4100 but <i>dos::kan</i>	This work
JMH1479	MC4100 transformed with plasmid pSE420	This work
JMH1480	W3110 transformed with plasmid pSE420	This work
JMH1481	MG1655 transformed with plasmid pSE420	This work
JMH1482	TOB1 transformed with plasmid pSE420	This work
JMH1483	MC4100 transformed with plasmid pYddV	This work
JMH1484	W3110 transformed with plasmid pYddV	This work
JMH1485	MG1655 transformed with plasmid pYddV	This work
JMH1486	TOB1 transformed with plasmid pYddV	This work
JMH0761	W3110 but <i>dos::kan</i>	This work
JMH1493	MG1655 but <i>yddV-dos::kan</i>	This work
JMH1232	MC4100 but <i>ybeW::GBKan</i>	(2)
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ <i>argF-lac</i> U169 <i>rpsL150 flbB5301 deoCptsF25 rbsR relA1</i>	(3)
TOB1	Fecal isolate	(4)
TE2680	F ⁻ λ ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>) <i>lacX74 rpsL galK2 recD::Tn10d-Tet trpDC700::putPA13033::(Kan^s Cm^r lac)</i>	(5)
W3110	F ⁻ <i>lam -In(rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	(6)
MG1655	Wild type <i>E. coli</i> K-12	Fredrick Blattner
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (F ['] <i>proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10</i>)	Stratagene
Plasmids		
pUC18	Cloning vector	Pharmacia
pSE420	Ap ^R <i>lacI^qP_{trc}</i> cloning vector for over-expression	Invitrogen

pTZ19R	Cloning vector	Pharmacia
pMM4	pUC18 but bearing a 3.4 kb <i>dos::kan</i> construct carrying a 1.1 kb of each flanking region of <i>dos</i> cloned in the <i>EcoRI-PstI</i> sites	This work
pMM5	pTZ19R but bearing a 3.4 kb <i>dos::kan</i> construct carrying a 1.1 kb of each flanking region of <i>dos</i> cloned in the <i>EcoRI-PstI</i> sites	This work
pYddV	pSE420 but bearing the gene <i>yddV</i> cloned in the <i>NcoI-SacI</i> sites	This work
pUC4K-KIXX	Vector carrying a 1.3 kb <i>BamHI-BamHI kan</i> insert	Pharmacia
Phages		
P1 _{vir}	General transduction phage	(7)

TABLE II. GENES UPREGULATED UNDER HIGH C-DI-GMP INTRACELLULAR LEVELS

Gene	b number	Induction fold	Description
<i>pssA</i>	b2585	34	Phosphatidylserine synthase; phospholipid synthesis
<i>rcaA</i>	b1951	31	Transcriptional activator of capsular/exo- polysaccharide synthesis (LuxR/UhpA family).
<i>b1781</i>	b1781	29	Putative oxidoreductase, NAD(P)-linked. Aldo/keto reductases, related to diketogulonate reductase
<i>b1490</i>	b1490	28	Hypothetical protein
<i>fur</i>	b0683	26	Transcriptional repressor of iron transport (Fur family).
<i>yqcD</i>	b2794	23	Hypothetical protein. Enzyme related to GTP cyclohydrolase I
<i>psiF</i>	b0384	23	Induced by phosphate starvation
<i>emrB</i>	b2686	21	Permeases of the major facilitator superfamily. Multidrug transport protein
<i>sapD</i>	b1291	21	ABC-type antimicrobial peptide transport system, ATPase component
<i>tdcD</i>	b3115	20	Propionate kinase/acetate kinase II
<i>b1171</i>	b1171	19	Unknown
<i>ydcH</i>	b1426	19	Hypothetical protein
<i>yagL</i>	b0278	16	Site-specific recombinases, DNA invertase Pin homologs
<i>yggH</i>	b2960	15	Predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
<i>ilvG</i>	b4488	15	Pseudogen
<i>b0964</i>	b0964	14	Uncharacterized protein conserved in bacteria
<i>lysU</i>	b4129	13	Lysyl-tRNA synthetase (class II)
<i>rpmB</i>	b3637	13	Ribosomal protein L28
<i>fdhF</i>	b4079	12	Anaerobic dehydrogenases, typically selenocysteine-containing
<i>lit</i>	b1139	12	E14 prophage; like phage T4 late gene expression
<i>ybdR</i>	b0608	12	Threonine dehydrogenase and related Zn-dependent dehydrogenases
<i>lplA</i>	b4386	11	Lipoate-protein ligase A
<i>yciK</i>	b1271	11	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)
<i>adiA</i>	b4117	11	Arginine/lysine/ornithine decarboxylases
<i>ynfL</i>	b1595	11	Transcriptional regulator

<i>b2755</i>	b2755	11	Uncharacterized protein predicted to be involved in DNA repair
<i>yjcS</i>	b4083	10	Alkyl sulfatase and related hydrolases
<i>treB</i>	b4240	10	Phosphotransferase system IIC y IIB components, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific
<i>rarD</i>	b3819	10	Chloramphenicol resistance
<i>yraR</i>	b3152	10	Predicted nucleoside-diphosphate-sugar epimerases
<i>rplR</i>	b3304	9	Ribosomal protein L18
<i>nadR</i>	b4390	9	Probable <i>nadAB</i> transcriptional regulator
<i>b2372</i>	b2372	8	Predicted permeases
<i>araG</i>	b1900	8	ABC-type sugar transport system, ATPase component
<i>yeiN</i>	b2165	8	Uncharacterized enzyme involved in pigment biosynthesis
<i>yhaC</i>	b3121	8	Hypothetical protein
<i>ylbF</i>	b0520	8	Putative carboxylase
<i>gyrA</i>	b2231	8	Type IIA topoisomerase (DNA gyrase/topo II, topoisomerase IV), A subunit
<i>ynaF</i>	b1376	8	Conserved hypothetical protein, adenine nucleotide-binding domain
<i>dniR</i>	b0211	7	Soluble lytic murein transglycosylase and related regulatory proteins (some contain LysM/invasin domains)
<i>yjyT</i>	b4371	7	16S RNA G1207 methylase RsmC
<i>cspB</i>	b1557	7	Cold shock proteins
<i>ahpC</i>	b0605	7	Peroxiredoxin
<i>yjgK</i>	b4252	7	Hypothetical protein
<i>b1044</i>	b1044	7	Hypothetical protein
<i>htrA</i>	b0161	7	Trypsin-like serine proteases, typically periplasmic, contain C-terminal PDZ domain
<i>uhpT</i>	b3666	6	Sugar phosphate permease
<i>cdh</i>	b3918	6	CDP-diacylglycerol pyrophosphatase
<i>hupA</i>	b4000	6	Bacterial nucleoid DNA-binding protein
<i>bglG</i>	b3723	6	Transcriptional antiterminator
<i>gapC</i>	b4493	6	Pseudogen
<i>yheL</i>	b3343	6	Uncharacterized conserved protein involved in oxidation of intracellular sulfur
<i>xapR</i>	b2405	6	Transcriptional regulator
<i>artP</i>	b0864	6	ABC-type arginine transport system, ATPase component

<i>ydhO</i>	b1655	6	Cell wall-associated hydrolases (invasion-associated proteins)
<i>smtA</i>	b0921	6	SAM-dependent methyltransferases
<i>galK</i>	b0757	6	Galactokinase
<i>phnJ</i>	b4098	6	Uncharacterized enzyme of phosphonate metabolism
<i>ydaL</i>	b1340	6	Uncharacterized protein conserved in bacteria
<i>nuoC</i>	b2286	6	NADH:ubiquinone oxidoreductase 49 kD subunit 7. NADH:ubiquinone oxidoreductase 27 kD subunit.
<i>ascB</i>	b2716	6	Beta-glucosidase/6-phospho-beta-glucosidase/beta-galactosidase
<i>acrA</i>	b0463	6	Membrane-fusion protein
<i>yghK</i>	b2975	6	L-lactate permease
<i>yiiS</i>	b3922	6	Uncharacterized protein conserved in bacteria
<i>rsuA</i>	b2183	5	16S rRNA uridine-516 pseudouridylate synthase and related pseudouridylate synthases
<i>yphB</i>	b2544	5	Galactose mutarotase and related enzymes
<i>lar</i>	b1348	5	Prophage
<i>aefA</i>	b0465	5	Small-conductance mechanosensitive channel
<i>b1587</i>	b1587	5	Anaerobic dehydrogenases, typically selenocysteine-containing
<i>yhaP</i>	b4471	5	L-serine dehydratase
<i>intE</i>	b1140	5	Integrase
<i>yhdH</i>	b3253	5	NADPH:quinone reductase and related Zn-dependent oxidoreductases
<i>yqhE</i>	b3012	5	2,5-diketo-D-gluconate reductase A (beta-keto ester reductase)
<i>ftsX</i>	b3462	5	Cell division protein
<i>entA</i>	b0596	5	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)
<i>mcrB</i>	b4346	5	Component of McrBC 5-methylcytosine restriction system
<i>leuB</i>	b0073	5	3-isopropylmalate dehydrogenase in leucine biosynthesis
<i>yggX</i>	b2962	5	Fe-S cluster protector protein
<i>ybaL</i>	b0478	5	Kef-type K ⁺ transport systems, predicted NAD-binding component
<i>yhaL</i>	b3107	5	Hypothetical protein
<i>goaG</i>	b1302	5	4-aminobutyrate aminotransferase and related aminotransferases
<i>nlpA</i>	b3661	5	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface antigen
<i>hydG</i>	b4004	5	Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type

			ATPase, and DNA-binding domains
<i>dicA</i>	b1570	5	Predicted transcriptional regulators
<i>hcaA</i>	b2538	5	Phenylpropionate dioxygenase and related ring-hydroxylating dioxygenases, large terminal subunit
<i>aroF</i>	b2601	5	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase
<i>soxS</i>	b4062	5	AraC-type DNA-binding domain-containing proteins
<i>yhaR</i>	b3113	5	Hypothetical protein.
<i>b1904</i>	b1904	4	Hypothetical protein.
<i>b1471</i>	b1471	4	Leucine-rich repeat (LRR) protein
<i>dxs</i>	b0420	4	Deoxyxylulose-5-phosphate synthase
<i>dgt</i>	b0160	4	dGTP triphosphohydrolase
<i>wzc</i>	b2060	4	Wzc catalyzes autophosphorylation on tyrosine. Autophosphorylation negatively regulates colanic acid biosynthesis
<i>nei</i>	b0714	4	[L] Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
<i>ygiN</i>	b3029	4	Uncharacterized conserved protein
<i>ydaH</i>	b1336	4	Putative p-aminobenzoyl-glutamate transporter
<i>sanA</i>	b2144	4	Uncharacterized membrane protein
<i>yhfG</i>	b3362	4	Hypothetical protein.
<i>fhuB</i>	b0153	4	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, permease component
<i>glk</i>	b2388	4	Glucokinase
<i>wcaD</i>	b2056	4	Putative colanic acid polymerase
<i>ydaU</i>	b1359	4	Uncharacterized protein conserved in bacteria
<i>araH</i>	b4460	4	high-affinity L-arabinose transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>yeaJ</i>	b1786	4	GGDEF domain-containing protein
<i>gmk</i>	b3648	4	Guanylate kinase
<i>yeaK</i>	b1787	4	Uncharacterized conserved protein
<i>fdnH</i>	b1475	4	Fe-S-cluster-containing hydrogenase components
<i>ydiT</i>	b1700	4	Ferredoxin-like protein

Table III. Genes repressed under high c-di-GMP

GENE	B	REPRESSION	DESCRIPTION
	NUMBER	FOLD	
<i>YHIE</i>	B3512	21	DNA-BINDING HTH DOMAIN-CONTAINING PROTEINS
<i>ACEA</i>	B4015	11	ISOCITRATE LYASE
<i>UHPC</i>	B3667	10	SUGAR PHOSPHATE PERMEASE
<i>YMGE</i>	B1195	10	PREDICTED MEMBRANE PROTEIN
<i>B2430</i>	B2430	10	BETA-LACTAMASE CLASS C AND OTHER PENICILLIN BINDING PROTEINS
<i>GLTA</i>	B0720	9	CITRATE SYNTHASE
<i>YHJU</i>	B3538	8	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>B1680</i>	B1680	8	SELENOCYSTEINE LYASE
<i>YDIC</i>	B1684	8	UNCHARACTERIZED CONSERVED PROTEIN
<i>GADB</i>	B1493	8	GLUTAMATE DECARBOXYLASE AND RELATED PLP-DEPENDENT PROTEINS
<i>WECG</i>	B3794	8	TEICHOIC ACID BIOSYNTHESIS PROTEINS
<i>YTFL</i>	B4218	8	HEMOLYSINS AND RELATED PROTEINS CONTAINING CBS DOMAINS
<i>PEPT</i>	B1127	8	DI- AND TRIPEPTIDASES
<i>HDEB</i>	B3509	8	HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>AMN</i>	B1982	7	NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE
<i>YJBA</i>	B4030	7	PREDICTED MEMBRANE PROTEIN
<i>GLPG</i>	B3424	7	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN, MEMBER OF GLP REGULON.
<i>B1759</i>	B1759	7	NTP PYROPHOSPHOHYDROLASES INCLUDING OXIDATIVE DAMAGE REPAIR ENZYMES
<i>B1688</i>	B1688	7	PREDICTED PERMEASE
<i>ATOB</i>	B2224	7	ACETYL-COA ACETYLTRANSFERASE
<i>B1966</i>	B1966	6	OUTER MEMBRANE PROTEIN (PORIN)
<i>ARGB</i>	B3959	6	ACETYLGLUTAMATE KINASE
<i>YDAM</i>	B1341	6	FOG: GGDEF DOMAIN AND FOG: PAS/PAC DOMAIN-CONTAINING PROTEIN

<i>YHIX</i>	B3516	6	ARAC-TYPE DNA-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEINS
<i>YNHE</i>	B1683	6	ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM INVOLVED IN FE- S CLUSTER ASSEMBLY, PERMEASE COMPONENT
<i>YJAD</i>	B3996	6	HYPOTHETICAL PROTEIN, MUTT-LIKE PROTEIN
<i>BCR</i>	B2182	6	PERMEASES OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>HDEA</i>	B3510	6	PERIPLASMIC PROTEIN THAT PLAYS A ROLE IN RESISTANCE TO LOW PH
<i>B2333</i>	B2333	6	P PILUS ASSEMBLY PROTEIN, PILIN FIMA
<i>YQHA</i>	B3002	6	PREDICTED MEMBRANE PROTEIN
<i>YAEH</i>	B0163	6	PUTATIVE STRUCTURAL PROTEIN
<i>ARTQ</i>	B0862	6	ABC-TYPE ARGININE TRANSPORT SYSTEM, PERMEASE COMPONENT
<i>YJIJ</i>	B4332	6	PERMEASES OF THE MAJOR FACILITATOR SUPERFAMILY
<i>B2433</i>	B2433	5	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>YAEL</i>	B0176	5	PREDICTED MEMBRANE-ASSOCIATED ZN- DEPENDENT PROTEASES 1
<i>YBDN</i>	B0602	5	PREDICTED PHOSPHOADENOSINE PHOSPHOSULFATE SULFOTRANSFERASE
<i>AROD</i>	B1693	5	3-DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE
<i>PYRI</i>	B4244	5	ASPARTATE CARBAMOYLTRANSFERASE, REGULATORY SUBUNIT
<i>METR</i>	B3828	5	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
<i>PANB</i>	B0134	5	KETOPANTOATE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE
<i>OPPB</i>	B1244	5	ABC-TYPE DIPEPTIDE/OLIGOPEPTIDE/NICKEL TRANSPORT SYSTEMS, PERMEASE COMPONENTS
<i>YFCA</i>	B2327	5	PREDICTED PERMEASES
<i>YBCU</i>	B0557	5	BACTERIOPHAGE LAMBDA BOR LIPOPROTEIN HOMOLOG,
<i>YAFW</i>	B0246	5	CP4-6 PROPHAGE.
<i>PFS</i>	B0159	5	NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE

<i>HEMD</i>	B3804	5	UROPORPHYRINOGEN-III SYNTHASE
<i>B0753</i>	B0753	5	PUTATIVE HOMEBOX PROTEIN
<i>YRBF</i>	B3195	5	ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM INVOLVED IN RESISTANCE TO ORGANIC SOLVENTS, ATPASE COMPONENT
<i>B2253</i>	B2253	5	PUTATIVE AMINOTRANSFERASE
<i>YFHH</i>	B2561	5	TRANSCRIPTIONAL REGULATORS
<i>HYAB</i>	B0973	5	NI,FE-HYDROGENASE I LARGE SUBUNIT
<i>YGHQ</i>	B2983	5	PUTATIVE SERINE PROTEASE
<i>PLDB</i>	B3825	5	LYSOPHOSPHOLIPASE L(2)
<i>B1516</i>	B1516	5	ABC-TYPE SUGAR TRANSPORT SYSTEM, PERIPLASMIC COMPONENT
<i>YGBI</i>	B2735	5	TRANSCRIPTIONAL REGULATORS OF SUGAR METABOLISM
<i>B2363</i>	B2363	5	CPS-53 (KPLE1) PROPHAGE
<i>CITF</i>	B0615	5	CITRATE LYASE, ALPHA SUBUNIT
<i>YMFR</i>	B1150	5	HYPOTHETICAL PROTEIN IN LAMBDOID PROPHAGE E14 REGION
<i>YEIC</i>	B2166	5	SUGAR KINASES, RIBOKINASE FAMILY
<i>B1199</i>	B1199	5	DIHYDROXYACETONE KINASE
<i>YDEW</i>	B1512	4	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, CONTAINS SIGMA FACTOR-RELATED N-TERMINAL DOMAIN
<i>AGAD</i>	B3140	4	PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM, MANNOSE/FRUCTOSE/N- ACETYLGALACTOSAMINE-SPECIFIC COMPONENT IID
<i>NUOB</i>	B2287	4	NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE 20 KD SUBUNIT AND RELATED FE-S OXIDOREDUCTASES
<i>YCDP</i>	B1021	4	PUTATIVE MEMBRANE PROTEIN
<i>YIEP</i>	B3755	4	TRANSCRIPTIONAL REGULATORS
<i>OMPC</i>	B2215	4	OUTER MEMBRANE PROTEIN (PORIN)
<i>TRER</i>	B4241	4	TRANSCRIPTIONAL REGULATORS
<i>HOFF</i>	B3327	4	TYPE II SECRETORY PATHWAY, COMPONENT PULF

<i>SEQA</i>	B0687	4	NEGATIVE REGULATOR OF REPLICATION INITIATIONR
<i>B2083</i>	B2083	4	PHAGE PROTEIN D
<i>DSBB</i>	B1185	4	DISULFIDE BOND FORMATION PROTEIN DSBB
<i>GCVA</i>	B2808	4	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
<i>SDAC</i>	B2796	4	AMINO ACID PERMEASES
<i>XASA</i>	B1492	4	AMINO ACID TRANSPORTERS
<i>YIAI</i>	B3573	4	FE-S-CLUSTER-CONTAINING HYDROGENASE COMPONENTS 2
<i>MDLB</i>	B0449	4	ABC-TYPE MULTIDRUG TRANSPORT SYSTEM, ATPASE AND PERMEASE COMPONENTS
<i>MOAA</i>	B0781	4	MOLYBDENUM COFACTOR BIOSYNTHESIS ENZYME
<i>CCMA</i>	B2201	4	ABC-TYPE TRANSPORT SYSTEM INVOLVED IN CYTOCHROME C BIOGENESIS, ATPASE COMPONENT
<i>YCDG</i>	B1006	4	PUTATIVE URACIL TRANSPORT PROTEIN
<i>GPPA</i>	B3779	4	EXOPOLYPHOSPHATASE
<i>SDHA</i>	B0723	4	SUCCINATE DEHYDROGENASE/FUMARATE REDUCTASE, FLAVOPROTEIN SUBUNIT
<i>TALB</i>	B0008	4	TRANSALDOLASE
<i>B1760</i>	B1760	4	HYPOTHETICAL PROTEIN
<i>B2387</i>	B2387	4	PHOSPHOTRANSFERASE SYSTEM FRUCTOSE- SPECIFIC COMPONENT IIB
<i>YBDG</i>	B0577	4	SMALL-CONDUCTANCE MECHANOSENSITIVE CHANNEL

**TABLE IV. GGDEF AND EAL DOMAIN-CONTAINING PROTEINS IN THE
ESCHERICHIA COLI GENOME**

GGDEF DOMAIN	EAL DOMAIN	BOTH DOMAINS
<i>YDDV</i>	<i>YCGG</i>	<i>YFEA</i>
<i>YLIF</i>	<i>RTN</i>	<i>YEGE</i>
<i>YAIC</i>	<i>YDIV</i>	<i>YCIR</i>
<i>YCDT</i>	<i>YOAD</i>	<i>YHJK</i>
<i>YDAM</i>	<i>YLAB</i>	<i>YHDA</i>
<i>YNEF</i>	<i>YLIE</i>	<i>YFGF</i>
<i>YDEH</i>	<i>YCGF</i>	<i>DOS</i>
<i>YEAJ</i>	<i>YHJH</i>	
<i>YEAJ</i>	<i>YJCC</i>	
<i>YEDQ</i>	<i>YAHA</i>	
<i>YFIN</i>		

REFERENCES

1. Wackernagel, W. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 306-311
2. Chaveroche, M., Ghigo, J., and d'Enfert, C. (2000) *Nucleic. Acids. Res.* **28**, E97
3. Casadaban, M. (1976) *J. Mol. Biol.* **104**, 541-555
4. Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Romling, U. (2001) *Mol. Microbiol.* **39**, 1452-1463
5. Elliott, T. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 245-253
6. Pratt, L. and Kolter, R. (1998) *Mol. Microbiol.* **30**, 285-293
7. Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

ANEXO 2

TRANSCRIPTIONAL REGULATION AND MUTAGENESIS ANALYSIS OF THE *yddV-dos* OPERON INVOLVED IN THE CONTROL OF THE INTRACELLULAR LEVELS OF THE SECOND MESSENGER c-di-GMP IN *Escherichia coli* K-12. A GENETIC AND GENOME-WIDE TRANSCRIPTIONAL PROFILE ANALYSIS *

M. Marcela Méndez-Ortiz^{‡1}, Juan L. Chávez-Pacheco^{‡§}, Miguel A. Ramírez-Romero[‡], Martha L. Contreras-Zentella[§], Edgardo Escamilla[§] and Jorge Membrillo-Hernández^{‡2}

From [‡]Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, and [‡]Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Running Title: Transcriptional regulation of the *yddV-dos* operon in *E. coli*

Address correspondence to: Jorge Membrillo-Hernández, Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. P. O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, México, Tel.: +52 55 56223840; Fax: +52 55 55500048; Email: jmh@biomedicas.unam.mx

SUMMARY

Cyclic diguanylic acid (c-di-GMP; cGpGp) is ubiquitous second messenger in bacteria. Cellular concentrations of c-di-GMP depend on two opposite activities, diguanylate cyclase (assigned to the widespread GGDEF domain) and c-di-GMP specific phosphodiesterase (associated to proteins harboring the EAL domain). To date, little is known about the targets of c-di-GMP in the cell, or if it affects transcriptional regulation of certain genes. Here we report on the transcriptional regulation of the *E. coli* operon *yddV-dos* encoding for a diguanylate cyclase GGDEF-bearing protein (YddV) and a phosphodiesterase EAL-bearing heme-based redox sensor protein (Dos). We show that this operon is actively transcribed in stationary phase of aerobic growth in an RpoS-dependent manner. Anoxia or high levels of c-di-GMP result in a severe repression of this operon, even in stationary phase of growth, suggesting the presence of a c-di-GMP-responding transcriptional regulator responsible for the *yddV-dos* repression. The lack of YddV and Dos affected the transcriptional activities of several membrane-bound protein encoding genes implicating again the GGDEF and EAL carrying proteins in cell

wall/envelope/membrane biosynthesis processes.

INTRODUCTION

Cyclic di-guanylic acid (c-di-GMP) is a second messenger that modulates the cell surface properties of several microorganisms (1-3). Concentrations of c-di-GMP in the cell are controlled by the opposing activities of diguanylate cyclases (DGC) and phosphodiesterases (PDE), which are carried out by proteins harboring GGDEF and EAL domains respectively (4-9). Interestingly, genes encoding these proteins are found in most bacterial phyla but are absent from Archae and Eukarya (1,3,10). For instance, 54 copies exist in *P. aeruginosa*, 53 in *V. cholerae* and 26 copies in *S. typhimurium*, the extreme example is *V. vulnificus* carrying 99 (10,11).

The occurrence of DGC or PDE domain proteins in transmembrane or membrane-associated proteins that contain sensory domains led to the prediction that diguanylate cyclases (GGDEF domain) or phosphodiesterases (EAL domain) were important in relaying external sensory information into the cytoplasm. Environmental stimuli, such as molecular oxygen, amino acids, electrons and photons, are believed to regulate the activity of DGC or PDEA proteins (1,3,12). Very recently, it has been demonstrated that

one of the regulatory function mediated by c-di-GMP is the control of gene expression. For example, the intracellular c-di-GMP levels are reduced in the early stages of cholera disease, leading to the activation of virulence genes and repression of biofilm-formation genes (13-15). In the same way, reduction of c-di-GMP levels in *S. typhimurium* activates the expression of virulence genes required for survival within host cells (16). We and others have taken a genomic approach to reveal the transcriptional profile and the phenotypic consequences of elevated c-di-GMP concentrations in the cytoplasm by modulating the expression of proteins with DGC domains from inducible promoters (17,18).

Genomic studies have identified 19 proteins with a GGDEF domain in *Escherichia coli*, the function of most of them remains largely unknown (11). Taking the amino acid sequence of DGC1 (diguanylate cyclase) from *Gluconacetobacter xylinus* as template, we found that one of the closest matches (31% identical in the GGDEF domain) to this protein in *E. coli* was the product of the gene *yddV* also named *yhcK* or *b1490*. The main difference between YddV and DGC1 is the presence of a PAS domain in DGC1. In a previous report we showed that *yddV* is co-transcribed with *dos* a heme-base oxygen sensor with c-di-GMP specific phosphodiesterase activity (17). A *dos::kan* mutation rendered the cells unable to divide properly, suggesting that *dos* and *yddV* may be part of a fine-tuning mechanism for regulating the intracellular levels of c-di-GMP. In this communication we continued the study of the *yddV-dos* operon and determined its transcriptional regulation. Our results indicate that this operon is induced mainly at the onset of stationary phase in an RpoS-dependent manner and that the *yddV-dos* operon is transcribed at very low levels in the absence of oxygen. Interestingly, *yddV-dos* is highly repressed when high levels of c-diGMP are present in the cell.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains, plasmids, phages and cell growth-All the strains used were *E. coli* K-12 derivatives (19). Luria-Bertani (LB)

medium plus glucose (0.2%) was prepared as previously described (20). Minimal medium plus 0.2% casaminoacids and 0.001% tryptophan was used (21). Glucose (0.2%) or glycerol (0.2%) was used as carbon source. Nitrate (40 mM) was added as electron acceptor in anaerobic cultures. Culture optical density at 600nm (OD₆₀₀) was determined in an Ultrospec 3100 Pro Amersham spectrophotometer. Aerobic cultures were grown at 37°C with shaking (200 rpm) in 250-ml flasks containing 10 ml of medium. Anaerobic jars with the BBL Gas-Pack system were used for anaerobic growth at 37°C. The following antibiotic concentrations were used unless otherwise noted: ampicillin, 200 µg ml⁻¹; tetracycline, 25 µg ml⁻¹; kanamycin, 100 µg ml⁻¹; and chloramphenicol, 25 µg ml⁻¹. X-Gal at 40 µg ml⁻¹ was added to solid media. Oxidative stress was induced by the addition of methyl viologen (200 µM), sodium nitroprussiate (200 µM) or H₂O₂ (0.01 %).

DNA manipulation and ΔyddV-dos::kan mutant construction-Bacterial genomic DNA was obtained using the Genomic DNA isolation kit (Promega). Plasmid DNA was purified using the Miniprep kit (Qiagen). DNA fragments were amplified by PCR using *E. coli* chromosomal DNA as template. When necessary, specific restriction sites were incorporated at the 5' end of the primers to facilitate the cloning of the fragments in the appropriate vector. PCR reactions to amplify the regulatory regions of *yddV* and *dos* were carried out using *Taq precision* DNA polymerase (Invitrogen) under standard conditions. A *ΔyddV-dos::kan* mutant strain was constructed as previously described (17).

Construction of lacZ fusions to analyze promoter function-Transcriptional fusions were constructed by inserting the desired DNA fragments into plasmid pRS551 (22). This plasmid carries a cryptic *lacZ* operon and genes that confer resistance to both kanamycin and ampicillin. To construct the Φ (*dos-lacZ*) fusion, a 1153 bp fragment comprising 1066 bp upstream of the *dos* translational start site (Fig. 1 and 2A) was PCR amplified using primers MM5 (5'-CGT TAG GAT CCA CCG CAC CCA TCA TAT TTT GC-3') and MM6 (5'-GCT GAG AAT TCT CCT CTA TCC GGT

GAT CTT CTC TTC GG-3'). To construct the $\Phi(yddV-lacZ)_L$, a 2240 bp fragment containing 2135 bp of the regulatory region of *yddV* was PCR amplified using primers MM7 (5'-GAG **CGG ATC CAA CGG CAA TTT CCG CGG C-3'**) and MM8 (5'-CTG **GGA ATT CAG GGG TGA AAC TGG TCG TGG C-3'**). To construct the $\Phi(yddV-lacZ)_S$, a 886 bp fragment containing 781 bp of the regulatory region of *yddV* was PCR amplified using primers MM7 and MM9 (5'-CCG **AGA ATT CGA TCC GCT CGG TTC CGA TAC CCG-3'**). Each fragment was digested with *Bam*HI and *Eco*RI and cloned into pRS551 (22). Chromosomal single copy fusions were obtained by the method of Elliot (23). Briefly, plasmids containing the different *lacZ* fusions were linearized with *Xho*I and used to transform strain TE2680 [*F*⁻ λ -IN(*rrnD-rrnE*) Δ *lacX74 rpsL galK2 recD::Tn10d-Tet trpDC700::putPA13033::(Kan^s Cm^r lac)*] (23); Due to the presence of the *recD::Tn10* mutation and sequences inserted into the *trp* operon that are homologous to sequences in pRS plasmids, this strain recombines linear pRS551-based plasmids into its chromosome. The transformants were selected for kanamycin resistance and screened for sensitivity to ampicillin and chloramphenicol. P1_{vir} lysates were made to transduce the fusions into the desired genomic backgrounds. All fusion-carrying strains were checked by PCR and DNA sequencing.

DNA sequence analyses-GCG Wisconsin Package, NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>), Regulon DB (24) and Colibri server (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>) facilities were used for DNA sequence analyses.

RNA extraction for DNA microarray experiments-Cultures of strains MG1655 or its $\Delta yddV-dos::kan$ derivative strain were grown aerobically or anaerobically to mid exponential phase on LB (OD_{600nm}=0.6). Total RNA was then extracted from the pellets using the hot acid phenol/chloroform method and treated with DNase I essentially as described at <http://www.microarrays.org>. Isolated RNA was quantified on the basis of its absorption at 260 nm, visualized on an agarose gel to check quality, and stored at -70 °C until further use.

Microarray Procedures and Data Analysis-For microarray analyses, cDNA was synthesized and labeled using a protocol similar to that described by Rosenow *et al.* (25). The labeled cDNA was hybridized to Affymetrix Gene Chip *E. coli* antisense genome arrays as recommended by the manufacturer (<http://www.affymetrix.com>). Following 16 h of hybridization at 45 °C, the washing and stain of the array was automated by a GeneChip Fluidics Station controlled by Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software. For each condition, two biological replicates were done. The whole procedure was carried out at the Microarray facility of the National University of Mexico. Normalization of the data resulting from each array was performed using the Gen Arise software package (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). The statistically significant variation of expression in response to high levels of c-di-GMP was obtained by filtering out those genes that had a log₂ (expression ratio) higher or lower than two standard deviations of the average.

b-Galactosidase assays-Specific β -galactosidase activity was assayed at room temperature in cells permeabilized with chloroform and SDS, with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside being used as substrate, and expressed as Miller units [OD₄₂₀ per min per OD₆₀₀; (20)].

Transcriptional start site determinations-5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE) was performed. Total RNA was isolated from exponential (OD_{600nm}=0.5) and stationary phase (OD_{600nm}=2.0) cultures of strain MC4100 [*F*⁻ *araD139* (Δ *argF-lac*) *U169 rpsL150 flbB5301 deoC ptsF25 rbsR relA1*] transformed with plasmid pMM2 [pRS551 but $\Phi(yhcK-lacZ)_L$] as described above. 5'-RACE was performed using the 5'-RACE system version 2.0 (Invitrogen). For cDNA synthesis the OMNISCRIPIT kit (Qiagen) was used with primer LacZREV (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC G-3'). In the primary and secondary PCR, the adaptor-specific primers (provided in the kit) were used with the LacZREV or YhPE (5'-CGC GGC TTT AGC ACG AAT GGG CGG ATC TGC CTG TTC GAC AAG TCC GGT CCA C-3') primers,

respectively. PCR products were then sequenced using the YhPE primer in the automated sequencing unit of the Genomics Science Center of the National University of Mexico.

RESULTS

Genetic location and expression analysis of the yddV-dos operon under aerobic growth conditions-Comparative analysis of the DGC (diguanylate cyclase) and PDEA1 (phosphodiesterase) of *G. xylinus* with the *E. coli* genome led to the identification of the *yddV-dos* operon that is located at position 33.7 min of the *E. coli* chromosome (17). This genomic region includes the genes *yddW* (*b1491*) and *xasA* (also called *gadC*) (Fig. 1A). Despite detailed biochemical and biophysical studies on the Dos protein (26-31) and the biochemical evidence of the diguanylate cyclase activity of YddV (4,8,17,28), no information on the genetic expression of the *yddV-dos* operon is available.

In order to study the transcriptional activity of this operon, we constructed three different transcriptional fusions to *lacZ*: two Φ (*yddV-lacZ*) operon fusions bearing 781 [Φ (*yddV-lacZ*)_S] and 2135 [Φ (*yddV-lacZ*)_L] bp upstream of the translational start codon ATG of *yddV* (Fig. 2; see Experimental Procedures), and a Φ (*dos-lacZ*) fusion carrying 1066 bp upstream of the ATG of *dos* (Fig. 2A). The latter fusion was constructed to test the possibility that under certain growth conditions *dos* could be read as an independent transcriptional unit. All fusions were inserted into the *E. coli* chromosome and β -galactosidase activity levels determined throughout the bacterial growth cycle (Fig. 2B). Our first observation was that the Miller units displayed by the merodiploid strain bearing the Φ (*dos-lacZ*) fusion were low under all growth conditions tested, in agreement with our previous results that indicated that *dos* is part of an operon *yddV-dos*, but also suggesting that *dos* is not transcribed as an independent transcriptional unit (17). By contrast, merodiploid strains bearing the Φ (*yddV-lacZ*)_S or the Φ (*yddV-lacZ*)_L showed highest levels of

enzymatic activity in stationary phase (OD_{600nm}=2.0) of aerobic growth (Fig. 2B). Interestingly, low levels of expression were observed during the exponential phase of growth (OD_{600nm}=0.5) in both fusions (Fig. 2B). As similar levels of expression were observed for both Φ (*yddV-lacZ*) fusions we decided to use only the Φ (*yddV-lacZ*)_S fusion for further studies.

Expression analysis of the yddV-dos operon under anaerobic growth conditions-It has been suggested that the phosphodiesterase activity of Dos is lost upon exposure to oxygen (28) suggesting a potential different role depending on oxygen availability. To analyze the transcriptional regulation of *yddV-dos* in the absence of oxygen, the β -galactosidase activity levels of anaerobically growing cultures of strain JMH0923 [Φ (*yddV-lacZ*)_S] on LB-glucose or LB-nitrate were determined. Surprisingly, basal levels of expression were observed under anaerobic conditions, even during stationary phase (Fig. 2C and data not shown). So we reasoned that the transcription of the *yddV-dos* operon could possibly be triggered by oxidative stress conditions. However, addition of the superoxide generating agent methyl viologen (200 μ M), the nitrosative stress inducing agent sodium nitroprusside (200 μ M), or hydrogen peroxide (0.01%) did not change the levels of transcription of the *yddV-dos* operon (data not shown).

Effect of arcA, fnr, and rpoS mutations on the expression of the Φ (yddV-lacZ)_S transcriptional fusion-The vast majority of genes highly expressed in stationary phase of growth are regulated by RpoS, a stress and stationary phase-induced sigma factor (32). To test whether the *yddV-dos* operon was under the control of RpoS, we P1_{vir}-transduced the *rpoS::Tn10* allele from strain JMH0039 (33) into strain JMH0923 [Φ (*yddV-lacZ*)_S] to give strain JMH1005. As shown in Table I, a mutation in *rpoS* did not affect the β -galactosidase activity levels in exponential-phase of aerobic growth. However, when stationary phase culture cells were assayed, a sharp decrease (4-fold) was observed in the *rpoS* mutant strain (Table I). Moreover, the lack of RpoS had no effect on the anaerobic

levels of β -galactosidase (Table I). These results suggest that RpoS probably is a positive regulator of *yddV-dos* expression during stationary phase in aerobically grown cultures.

The low levels of $\Phi(yddV-lacZ)_S$ expression displayed under anaerobic conditions may indicate that proteins such as ArcA or Fnr, in charge of the transcriptional coordination of the redox switch, may be involved in the regulation of the *yddV-dos* operon. To test this idea, we transduced an *fnr::Tn9* or an *arcA::kan* mutation allele into strain JMH0923 [$\Phi(yddV-lacZ)_S$]. As shown in Table I, an *fnr* mutation did not have any effect on *yddV* transcriptional activity. By contrast, the lack of ArcA resulted in a 2-fold increase in exponential phase cells growing aerobically, however no change was observed in the expression levels in anaerobically grown cells, in either exponential or stationary phase (Table I). Close examination of the putative *yddV* promoter region revealed a near consensus (9/10) ArcA binding site 5'-**TGTgAATTAT**-3' [consensus (A,T)GTTAATTA(A,T); (34)] that overlaps with the RBS (Fig. 1A). These results indicate that ArcA could be repressing the expression of *yddV-dos* under aerobic conditions and that the anaerobic repression of the operon *yddV-dos* is independent of the anaerobic general regulator Fnr.

Transcriptional expression analysis of the $\Phi(yddV-lacZ)_S$ in cultures growing on different carbon sources-Sasakura *et al.* (28) reported that the heme-bearing protein Dos exhibits phosphodiesterase activity towards cAMP and that this was regulated by the heme redox state. We wondered whether cAMP was a regulatory signal for the transcription of the *yddV-dos* operon. To test this hypothesis, we grew strain JMH0923 [$\Phi(yddV-lacZ)_S$] at 37 °C in minimal media supplemented with glucose (low cAMP) or glycerol (high cAMP) and determined β -galactosidase activity throughout the growth cycle. Similar results to those of LB media cultures were obtained when minimal media were used (maximal expression was observed during stationary phase), however, no difference in expression was observed in cells growing on either glucose or glycerol as the sole carbon source, indicating that the levels of

cAMP do not affect *yddV-dos* expression (data not shown).

Effect of high levels of c-di-GMP on the transcriptional regulation of the yddV-dos operon-To test whether or not, the intracellular levels of c-di-GMP were involved in the *yddV-dos* operon transcriptional regulation, we took advantage of the plasmid pYddV where the expression of *yddV* is under the control of an IPTG-inducible promoter (17). The pYddV plasmid or the control pSE420 vector were transformed into the strain JMH0923 [$\Phi(yddV-lacZ)_S$] and the β -galactosidase activity levels were determined in exponential or stationary phase growing cultures after 1h from the addition of 1mM IPTG. Intracellular levels of c-di-GMP were determined by HPLC as previously described (17), under these conditions an abrupt increment of c-di-GMP is observed (Fig. 3 inset). As depicted in Fig. 3, a reduction of 70% or 90% in β -galactosidase activity was observed in exponential or stationary phase cultures respectively. These results strongly suggest the involvement of c-di-GMP in the transcriptional regulation of the *yddV-dos* operon.

Transcriptional start site determination of the yhcK-dos operon-In order to determine the transcriptional start site of the operon, we performed a 5'-RACE experiment (see Experimental Procedures) using total RNA extracted from cells carrying the $\Phi(yddV-lacZ)$ fusion growing in exponential or stationary phase of aerobic growth. As shown in Fig. 4, both sources of mRNA gave only one transcriptional start site, which was located 129 bp upstream of the translational start site ATG. Six bp upstream of the identified transcriptional start site, a putative Pribnow box was located (TAGATT, consensus TATAAT), however, no -35 box (consensus TTGACA) sequence was evident. This arrangement resembles those of σ^S regulated promoters (35). These results indicate that the *yddV-dos* is a bicistronic operon with only one transcriptional start site.

Genome wide transcriptional profile of a $\Delta yddV-dos::kan$ mutant strain-In order to identify those genes whose expression is altered by the lack of YddV and Dos, DNA microarray analyses were carried out on RNA samples extracted from cultures of strain MG1655 and

its $\Delta yddV-dos::kan$ derivative mutant strain. Results obtained from duplicate DNA microarray analyses were normalized and filtered for those genes with statistically significant variation of the transcription levels between the control and the mutant strains under aerobic or anaerobic growth conditions [i.e. \log_2 (expression ratio) higher or lower than 2 X S.D.]. Of 4288 genes analyzed, 198 under aerobic (4.6 % of the genome) and 305 under anaerobic (7.11 % of the genome) growth conditions passed the filter and were further analyzed. These genes were divided into two groups, those that were induced (73 aerobically and 212 anaerobically) and those that were repressed (125 aerobically and 93 anaerobically), and divided into functional categories based on NCBI, TIGR and ECOCYC gene annotations and data base searches for identified homologues. The affected genes were dispersed through nearly all of the functional categories, the most striking being genes related to unknown proteins (divided into hypothetical, conserved proteins, unclassified, and unknown, around 40% of the total number of altered genes Fig. 5). Under aerobic growth conditions, carbohydrate and amino acid transport were clearly affected by the lack of the *yddV-dos* operon (Fig. 5A), in contrast to the results in the absence of oxygen where no clear functional category affected was evident (Fig. 5B). A considerable number of cell envelope genes were also affected in both culture conditions (Fig. 5).

Genes encoding four transcriptional regulators were about 5-fold induced under aerobic conditions (namely, OxyR, YqgE, IscR and ArcA; Supplementary Table S1). OxyR and ArcA are involved in the redox regulation of the cell (36). IscR has been recently associated to iron-sulfur cluster assembly and to the control of O₂-regulated genes (37). Interestingly the highest induced gene by the absence of *yddV-dos* operon in the presence of oxygen is *b2854* coding for a putative soluble lytic murein transglycosylase, a protein whose homologues have been involved in pathogenesis (Supplementary Table S1). Murein transglycosylases are involved in the cell wall biogenesis process (38). In addition,

two of the most repressed genes under anaerobic growth conditions are *kdsA* and *yfbE* involved in cell wall/membrane/envelope biogenesis (Supplementary Table S4). A decrease in the expression of *kdsA* has been particularly associated with the phenotype of elongated cells due to fact that *kdsA* mutants are affected in the FtsZ-ring formation (39). These results indicate that the diguanylate cyclase activity of YddV or the phosphodiesterase activity of Dos should be involved in some way in cell wall biogenesis. This is in good agreement with the previously reported changes in bacterial cell shape of *dos* or *yddV-dos* mutant strains (17,31).

Most of the genes induced under anaerobic conditions in the $\Delta yddV-dos::kan$ strain were of unknown function; interestingly, the *yccZ* gene (*b0983*), a predicted exopolysaccharide export protein involved in cell wall biosynthesis, is heavily induced (14.7-fold; Supplementary Table S2), again suggesting a possible role of YddV or Dos in cell envelope processes. In addition, heavily repressed genes under anaerobic growth conditions in the $\Delta yddV-dos::kan$ strain included *wecF* (*b3793*) *yhaH* (*b3103*) *ydH* (*b3676*) and *kdsA* also involved in cell surface architecture process (Supplementary Table S4). To our surprise, the DNA microarray analyses revealed that the transcriptional activity of 22 genes was repressed by the lack of *yddV-dos* regardless the availability of oxygen (Table. II; Supplementary Tables S3 and S4). This becomes relevant if we consider that only three common genes were induced by the lack of *yddV-dos* in the presence or absence of oxygen (Supplementary Tables S1 and S3). Half of the 22 genes are involved in membrane trafficking of molecules (Table II).

DISCUSSION

The c-di-GMP signaling network links environmental stimuli to specific adaptive responses of bacterial species (for a recent review see (40)). However almost every aspect of c-di-GMP signaling remains largely uncharacterized. We are still ignorant of mechanisms involved in the signal transduction pathways and how is the c-di-GMP signaling network interconnected with other global

networks operating in bacterial cells. Most GGDEF and EAL domains are associated with predicted signal input domains suggesting that a wide variety of environmental signals can be perceived and transmitted by the c-di-GMP network (3,11). In this study we followed our studies on the function of diguanylate cyclase YddV (GGDEF-bearing) and the phosphodiesterase Dos (EAL-bearing) proteins of *E. coli*. The operon genetic arrangement of *yddV* with *dos* suggested that they both respond to only one regulatory region. This hypothesis was confirmed first by our previous RT-PCR analyses (17) and now by the β -galactosidase activity assays here presented using a defined $\Phi(yddV-lacZ)$ chromosomal fusion. In addition, our results provided additional evidence that *dos* is not transcribed as an independent transcriptional unit. This was further supported by the identification of the transcriptional start site of the operon (Fig. 4). Interestingly only one transcriptional start site was found under all the growth conditions tested suggesting the presence of only one promoter and a probable equal amount of mRNA for both genes, however, a posttranscriptional regulation cannot be ruled out at this time. As YddV has been shown to have diguanylate cyclase activity and Dos to have phosphodiesterase activity, it is tempting to speculate that they may be regulated similarly to the toxin-antitoxin systems where one of the proteins or the activities is lost upon exposure to a specific stimulus (41). Such is the case of *G. xylinus*, where the cellular levels of c-di-GMP are regulated by the opposite activities of DGC1 (c-di-GMP synthase) and PDEA1 (c-di-GMP phosphodiesterase), however, oxygen is the master regulator because PDEA1 activity is dependent on the redox status of its heme-based PAS domain (28). Therefore, *G. xylinus* produces cellulose only under aerobic growth conditions where the phosphodiesterase activity of PDEA1 is lost (28,42). Remarkably, *yddV* and *dos* are found in a similar genetic arrangement as the three pairs of *pdeA-dgc* genes in *G. xylinus* (28,42) although in *E. coli*, they are in an inverted order (diguanylate cyclase-phosphodiesterase). Only an additional pair of genes *yliE* (b0833; EAL-bearing)-*yliF* (b0834; GGDEF-bearing) is in

such arrangement in the *E. coli* genome (<http://www.tigr.org>). No transcriptional or functional information on the role of *yliE* and *yliF* is known but *yliF* apparently is required in optimum growth conditions (rich medium at 37 °C) but not in the cold and in minimal medium (43). Based on the fact that Dos is homologous to PDEA1, it was suggested that the phosphodiesterase activity Dos (a heme based oxygen sensor) may be inactive upon exposure to oxygen (28,44). So that we can envision that c-di-GMP is being produced by YddV mainly under aerobic growth conditions and is being hydrolyzed by Dos only under anaerobic growth conditions. This may constitute a novel oxygen sensing mechanism probably involved in the regulation of the levels of c-di-GMP under anoxic growth conditions. However, analyses of a $\Delta dos::kan$ and a $\Delta yddV-dos::kan$ mutant strains showed that only the $\Delta yddV-dos$ double mutant was significantly affected in growth, in contrast to the $\Delta dos::kan$ single mutant. Probably, as it has been suggested for *Salmonella*, the presence of different GGDEF or EAL domain containing proteins may compensate for the lack of *yddV* or *dos* (45). Though, it may be that the lack of both genes is deleterious only for a specific metabolic process where the c-di-GMP produced by YddV is necessary, supporting the idea that c-di-GMP may be under complex regulatory constraints in microcompartments (46). Our data suggest that the *yddV-dos* operon is transcriptionally active in stationary phase of aerobic growth in an RpoS dependent manner, this fact correlates well with the -10 Pribnow box identified in the vicinity of the transcriptional start site, with a very recent parallel study presented elsewhere (46) and with previous observations in *G. xylinus* and other bacteria where cellulose production is only seen in stationary phase and under aerobic conditions (47); However no data has been reported on the regulation of any *dgc* or *pdeA1* genes of *G. xylinus*. Interestingly, by looking up at their gene arrangement, *pdeA1* and *dgc1* may also be co-transcribed (42). The *yddV-dos* operon is shut down under anaerobic conditions suggesting that a redox-response regulator may be involved, our data indicated that Fnr is not involved and that ArcA could be a mild

regulator. Further studies are required for the identification of the putative redox-responsive regulator. Despite the fact that Dos can bind oxygen or NO (26), transcription of *yddV-dos* was not affected neither by oxidative nor by nitrosative stresses. One of the most striking findings of this study was the fact that the *yddV-dos* operon is repressed by high levels of c-di-GMP even in stationary phase of growth indicating that this regulation overrides the RpoS induction suggesting a feedback transcriptional regulatory circuit that could imply the presence of a transcriptional regulator directly responding to the changing levels of c-di-GMP. This type of transcriptional regulation reinforces the recent proposal of the group of Urs Jenal that described for the first time a feedback control of c-di-GMP production by an allosteric control of diguanylate cyclases (48). It is now important to know whether or not transcriptional regulators activated or inactivated by direct contact with c-di-GMP are present in the cell. This is not difficult to imagine as enhancement of c-di-GMP levels by overexpression of the GGDEF domain protein AdrA lead to the activation of curli fimbriae biosynthesis through the elevated expression of *csgD* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (49). A final point on transcriptional regulation is that, apart from c-di-GMP, the only other identified substrate for the phosphodiesterase activity of Dos has been cAMP (31), although, apparently, the activity reported for pure Dos is approximately 50-fold lower than the normal cAMP phosphodiesterase cellular activity (44). Our data support the view that probably *In vivo* cAMP levels are independent of Dos since transcriptional studies with a $\Phi(yddV-lacZ)$ fusion showed that a

drastic change in cAMP levels had no effect on the transcriptional activity of the fusion.

The transcriptional profile of a $\Delta yddV-dos::kan$ mutant strain showed evidence again that proteins with GGDEF and EAL domains should be involved in some kind of cell wall/membrane/envelope biogenesis as many of the most induced or repressed genes are involved in these processes. For example, the highest induced gene, *b2854*, codes for a lytic transglycosylase that plays an important role in the metabolism of the bacterial cell wall (38). In addition, in the absence of oxygen, one of the most repressed gene by the lack of *yddV-dos* was *kdsA*, coding for the 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) 8-phosphate synthetase which catalyses the first step in the synthesis of KDO, the linker between lipid A and oligosaccharide of lipopolysaccharide (LPS). Mutants in *kdsA* are consequently affected in the production of KDO causing instability of the outer membrane that provokes a defective FtsZ-ring formation (39). This would very well explain the abnormal cell-shape that has been observed previously in *dos* mutant strains (17,31), however, additional experiments must be carried out to test this hypothesis. Finally, the deletion of *yddV-dos* had a negative effect on the transcription of 22 genes, regardless the availability of oxygen, these results would be explained by the recent proposal that c-di-GMP may act locally in microcompartments, so probable, the c-di-GMP produced by YddV cannot be totally replaced by the other 18 GGDEF domain-bearing proteins (46).

REFERENCES

1. Romling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M. Y. (2005) *Mol Microbiol* **57**(3), 629-639
2. Romling, U., and Amikam, D. (2006) *Curr Opin Microbiol* **9**(2), 218-228
3. Jenal, U. (2004) *Curr Opin Microbiol* **7**(2), 185-191
4. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Romling, U. (2004) *Mol Microbiol* **53**(4), 1123-1134
5. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004) *Genes Dev* **18**(6), 715-727

6. Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., and Jenal, U. (2005) *J Biol Chem* **280**(35), 30829-30837
7. Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvina, O. V., and Gomelsky, M. (2005) *J Bacteriol* **187**(5), 1792-1798
8. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., and Gomelsky, M. (2005) *J Bacteriol* **187**(14), 4774-4781
9. Tamayo, R., Tischler, A. D., and Camilli, A. (2005) *J Biol Chem* **280**(39), 33324-33330
10. Galperin, M. Y. (2004) *Environ Microbiol* **6**(6), 552-567
11. Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., and Koonin, E. V. (2001) *FEMS Microbiol Lett* **203**(1), 11-21
12. D'Argenio, D. A., and Miller, S. I. (2004) *Microbiology* **150**(Pt 8), 2497-2502
13. Lim, B., Beyhan, S., Meir, J., and Yildiz, F. H. (2006) *Mol Microbiol* **60**(2), 331-348
14. Tischler, A. D., and Camilli, A. (2005) *Infect Immun* **73**(9), 5873-5882
15. Tischler, A. D., and Camilli, A. (2004) *Mol Microbiol* **53**(3), 857-869
16. Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M. U., Darwin, K. H., Singh, S., Jones, R. A., Ehrhart, S., Zhang, Z., Gaffney, B. L., Gandotra, S., Holden, D. W., Murray, D., and Nathan, C. (2005) *Mol Microbiol* **56**(5), 1234-1245
17. Mendez-Ortiz, M. M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Membrillo-Hernandez, J. (2006) *J Biol Chem* **281**(12), 8090-8099
18. Beyhan, S., Tischler, A. D., Camilli, A., and Yildiz, F. H. (2006) *J Bacteriol* **188**(10), 3600-3613
19. Blattner, F. R., Plunkett, G., III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) *Science* **277**(5331), 1453-1462
20. Miller, J. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
21. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
22. Simons, R. W., Houtman, F., and Kleckner, N. (1987) *Gene* **53**(1), 85-96
23. Elliott, T. (1992) *J Bacteriol* **174**(1), 245-253
24. Salgado, H., Gama-Castro, S., Peralta-Gil, M., Diaz-Peredo, E., Sanchez-Solano, F., Santos-Zavaleta, A., Martinez-Flores, I., Jimenez-Jacinto, V., Bonavides-Martinez, C., Segura-Salazar, J., Martinez-Antonio, A., and Collado-Vides, J. (2006) *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue), D394-397
25. Rosenow, C., Saxena, R. M., Durst, M., and Gingeras, T. R. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**(22), E112
26. Delgado-Nixon, V. M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M. A. (2000) *Biochemistry* **39**(10), 2685-2691
27. Kurokawa, H., Lee, D. S., Watanabe, M., Sagami, I., Mikami, B., Raman, C. S., and Shimizu, T. (2004) *J Biol Chem* **279**(19), 20186-20193
28. Sasakura, Y., Hirata, S., Sugiyama, S., Suzuki, S., Taguchi, S., Watanabe, M., Matsui, T., Sagami, I., and Shimizu, T. (2002) *J Biol Chem* **277**(26), 23821-23827

29. Sasakura, Y., Kanda, K., Yoshimura-Suzuki, T., Matsui, T., Fukuzono, S., Han, M. H., and Shimizu, T. (2004) *Anal Chem* **76**(22), 6521-6527
30. Taguchi, S., Matsui, T., Igarashi, J., Sasakura, Y., Araki, Y., Ito, O., Sugiyama, S., Sagami, I., and Shimizu, T. (2004) *J Biol Chem* **279**(5), 3340-3347
31. Yoshimura-Suzuki, T., Sagami, I., Yokota, N., Kurokawa, H., and Shimizu, T. (2005) *J Bacteriol* **187**(19), 6678-6682
32. Hengge-Aronis, R. (2000) *The general stress response in Escherichia coli*, ASM Press, Washington DC.
33. Corona-Izquierdo, F. P., and Membrillo-Hernandez, J. (2002) *FEMS Microbiol Lett* **211**(1), 105-110
34. Liu, X., and De Wulf, P. (2004) *J Biol Chem* **279**(13), 12588-12597
35. Lee, S. J., and Gralla, J. D. (2002) *J Biol Chem* **277**(49), 47420-47427
36. Bauer, C. E., Elsen, S., and Bird, T. H. (1999) *Annu Rev Microbiol* **53**, 495-523
37. Giel, J. L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F. R., and Kiley, P. J. (2006) *Mol Microbiol* **60**(4), 1058-1075
38. van Asselt, E. J., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Takacs, B., Keck, W., and Dijkstra, B. W. (1999) *Structure* **7**(10), 1167-1180
39. Fujishima, H., Nishimura, A., Wachi, M., Takagi, H., Hirasawa, T., Teraoka, H., Nishimori, K., Kawabata, T., Nishikawa, K., and Nagai, K. (2002) *Microbiology* **148**(Pt 1), 103-112
40. Jenal, U., and Malone, J. (2006) *Annu Rev Genet* **40**, 385-407
41. Hayes, C. S., and Sauer, R. T. (2003) *Cell* **112**(1), 2-4
42. Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., and Benziman, M. (1998) *J Bacteriol* **180**(17), 4416-4425
43. Serina, S., Nozza, F., Nicastro, G., Faggioni, F., Mottl, H., Deho, G., and Polissi, A. (2004) *Research in Microbiology* **155**(8), 692-701
44. Gilles-Gonzalez, M. A., and Gonzalez, G. (2004) *J Appl Physiol* **96**(2), 774-783
45. Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., and Laso, I. (2002) *Mol Microbiol* **43**(3), 793-808
46. Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., tischendorf, G., Hengge, R. . (2006) *Mol Microbiol* **In press**
47. Chavez-Pacheco, J. L., Martinez-Yee, S., Contreras, M. L., Gomez-Manzo, S., Membrillo-Hernandez, J., and Escamilla, J. E. (2005) *J Appl Microbiol* **99**(5), 1130-1140
48. Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., and Jenal, U. (2006) *J Biol Chem*
49. Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Romling, U. (2006) *Mol Microbiol* **60**(3), 602-616

Acknowledgements- We are grateful to Luis Delgado-Olivares for technical assistance and to Miguel Páez-Silva for preparing culture media. We are grateful to Dr. Jorge Ramírez-Salcedo, José L. Santillán-Torres, Simón Guzmán-León and Lorena Chávez-González from the Microarray Unit of the National University of Mexico. Special thanks are given to Drs. M. L. Girard, M. Soberón and J. Martínez-Salazar for useful scientific advices.

FOOTNOTES

*This work was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Grants IN207703 (To J. M.-H.) and IN204605 (To. E. E.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México Grant 42580 (To J M.-H.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “*advertisement*” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹Recipient of a Ph.D. studentship from CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

²To whom correspondence should be addressed: Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. P. O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, México, Tel.: +52 55 56223840; Fax: +52 55 55500048; Email: jmh@biomedicas.unam.mx

³The abbreviations used are: PDE, phosphodiesterase; PAS, an acronym formed from the following names: *Drosophila* period clock protein (PER), vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and *Drosophila* single-minded protein (SIM); PCR, polymerase chain reaction. DGC, diguanylate cyclase; c-diGMP, 3',5'-cyclic diguanylic acid; GGDEF, the name of this domain is due to the conserved GG[DE][DE]F amino acid sequence pattern.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. A) Genomic region of the 33.7 min of the *Escherichia coli* centisome. The ORFs annotated in the Colibri server (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>) are shown by arrows. A putative ArcA box in the *yddV* promoter region is shown on top. Putative RBS of *yddV* is underlined and in bold letters. B) Domain comparison of *Gluconacetobacter xylinus* PDEA1 (phosphodiesterase) and DGC1 (diguanylate cyclase) with *Escherichia coli* Dos, and YddV proteins. The identified domains are depicted as found in the SwissProt web server (<http://ca.expasy.org/sprot/>).

FIG. 2. Transcriptional activity of the *yddV-dos* operon. A) Diagram showing the regulatory regions carried in three different fusions to *lacZ* (left); the position and the length of the fragments fused to *lacZ* are denoted by a black bars below the genetic map where the ORFs are indicated by white arrows. B) and C) β -Galactosidase activity of the strains bearing the three *lacZ* fusions described above. Cultures were grown under aerobic (B) or anaerobic (C) conditions. Cells were harvested in exponential ($OD_{600}=0.5$; white bars) or stationary phase ($OD_{600}=2.0$; filled bars) of growth and β -Galactosidase activity levels were determined. Standard deviation of at least six independent experiments is shown.

FIG. 3. Effect of high levels of c-di-GMP on the transcriptional activity of the *yddV-dos* operon. The strain JMHO923 [$\Phi(yddV-lacZ)$] was transformed with the control vector pSE420 or with the plasmid pYddV (17). Inset: Overexpression of YddV and the presence of high levels of c-di-GMP were determined by SDS-PAGE (C) and HPLC (A and B) respectively. Cultures of the JMHO923 strains transformed with the control vector pSE420 or the pYddV plasmid were harvested in exponential ($OD_{600}=0.5$; white bars) or stationary phase ($OD_{600}=2.0$; filled bars) of growth and the β -Galactosidase activity levels were determined. Standard deviation of at least six independent experiments is shown.

FIG. 4. Identification of the transcriptional start site of the *yddV-dos* operon. 5'-RACE experiments were carried out using exponential or stationary total RNA samples from cultures of strain XL1-Blue transformed with plasmid pMM2 [$\Phi(yddV-lacZ)$]. Primer LacZREV was used for cDNA synthesis. In the primary and secondary PCR, the adaptor-specific primers (provided in the Invitrogen kit) were used together with the LacZREV and YhPE primers, respectively (see Experimental procedures). PCR products were then sequenced using the YhPE primer. Top: chromatogram of both sequences showing the 5'-end of the transcript (identified by the poly-C sequence and denoted by an arrow). Bottom: DNA sequence of the promoter region of the *yddV-dos*, the transcriptional start site G is indicated by an arrow and the proposed -10 sequence is boxed.

FIG. 5. Functional classification of *E. coli* genes affected by the deletion of the *yddV-dos* operon under aerobic (A) or anaerobic (B) growth conditions. Black and hashed bars depict the number of genes with increased or decreased expression, respectively. The functional classes were obtained from Blattner *et al.* (19).

TABLES

TABLE I. β -Galactosidase activity of the $\Phi(yddV\text{-}'lacZ)_s$ fusion in different genetic backgrounds

Mutation	+O ₂		-O ₂	
	Exp ¹	St ¹	Exp	St
None	150 ² ± 25 ³	860 ± 40	160 ± 20	160 ± 10
<i>arcA</i>	385 ± 40	789 ± 20	180 ± 40	160 ± 10
<i>fnr</i>	160 ± 15	900 ± 95	190 ± 50	130 ± 25
<i>rpoS</i>	140 ± 35	200 ± 25	145 ± 25	130 ± 10

¹Exp, exponential phase of growth, St, stationary phase of growth

² β -Galactosidase specific activity is given in Miller Units (20)

³Standard deviation of at least six independent experiments is shown

TABLE II. Repressed genes in a $\Delta yddV$ -*dos::kan* strain in cultures grown aerobically and anaerobically.

b number	gene	Assigned or predicted function	Fold repressed anaerobically	Fold repressed aerobically
b0409	<i>secF</i>	Preprotein translocase subunit SecF. Intracellular trafficking secretion and vesicular	6.26	8.48
b0857	<i>potI</i>	ABC-type spermidine/putrescine transport system permease component II	5.02	6.06
b0862	<i>artQ</i>	ABC-type arginine transport system, permease component	4.02	5.58
b0893	<i>serS</i>	Seryl-tRNA synthetase	9.62	6.57
b1100	<i>ycfH</i>	Mg-dependent DNase	4.03	5.79
b1215	<i>kdsA</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) 8-phosphate synthase	8.71	13.69
b1493	<i>gadB</i>	Glutamate decarboxylase and related PLP-dependent proteins	6.80	15.66
b1788	<i>yoaI</i>	Hypothetical protein	5.40	4.24
b1929	<i>yedE</i>	Predicted transporter component	4.99	4.94
b2068	<i>aidA</i>	3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase	4.29	5.64
b2075	<i>yegN</i>	Cation/multidrug efflux pump	5.95	4.23
b2199	<i>ccmC</i>	ABC-type transport system involved in cytochrome c biogenesis, permease component	4.15	5.69
b2433	<i>yfeZ</i>	Hypothetical protein	7.25	4.40
b2845	<i>yqeG</i>	Amino acid permease	4.64	4.03
b2907	<i>ubiH</i>	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	4.73	9.41
b3027	<i>ygiZ</i>	Putative inner membrane protein	4.31	7.54
b3491	<i>yhiM</i>	Putative inner membrane protein	4.08	4.04

b3494	<i>uspB</i>	Universal stress protein	4.47	5.57
b3512	<i>gadE</i>	DNA-binding HTH domain-containing proteins	10.17	4.49
b3676	<i>yidH</i>	Predicted membrane protein	9.19	4.41
b3804	<i>hemD</i>	Uroporphyrinogen-III synthase	5.37	4.34
b3911	<i>cpxA</i>	Signal Transduction histine kinase	5.02	6.08

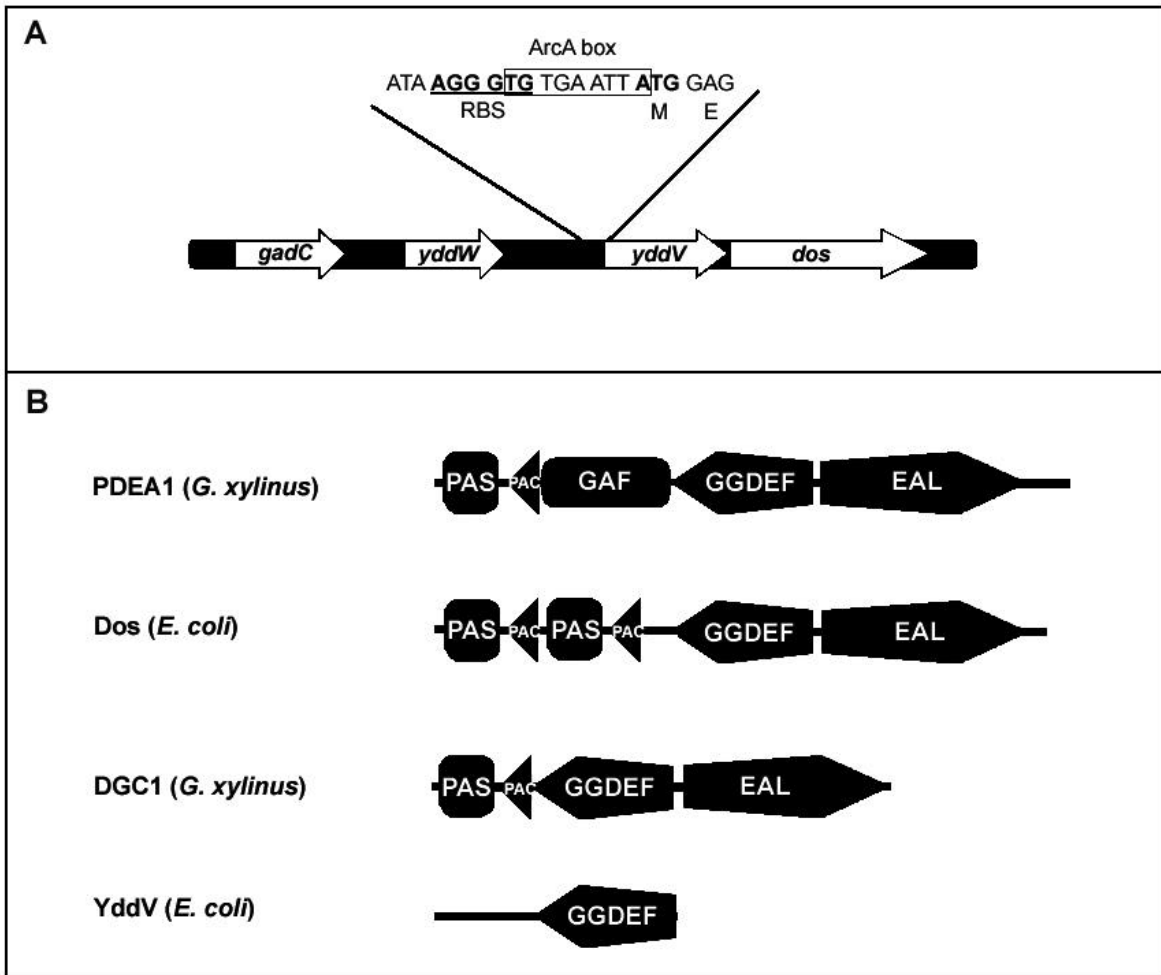


Figure 1. Méndez-Ortiz *et al.*

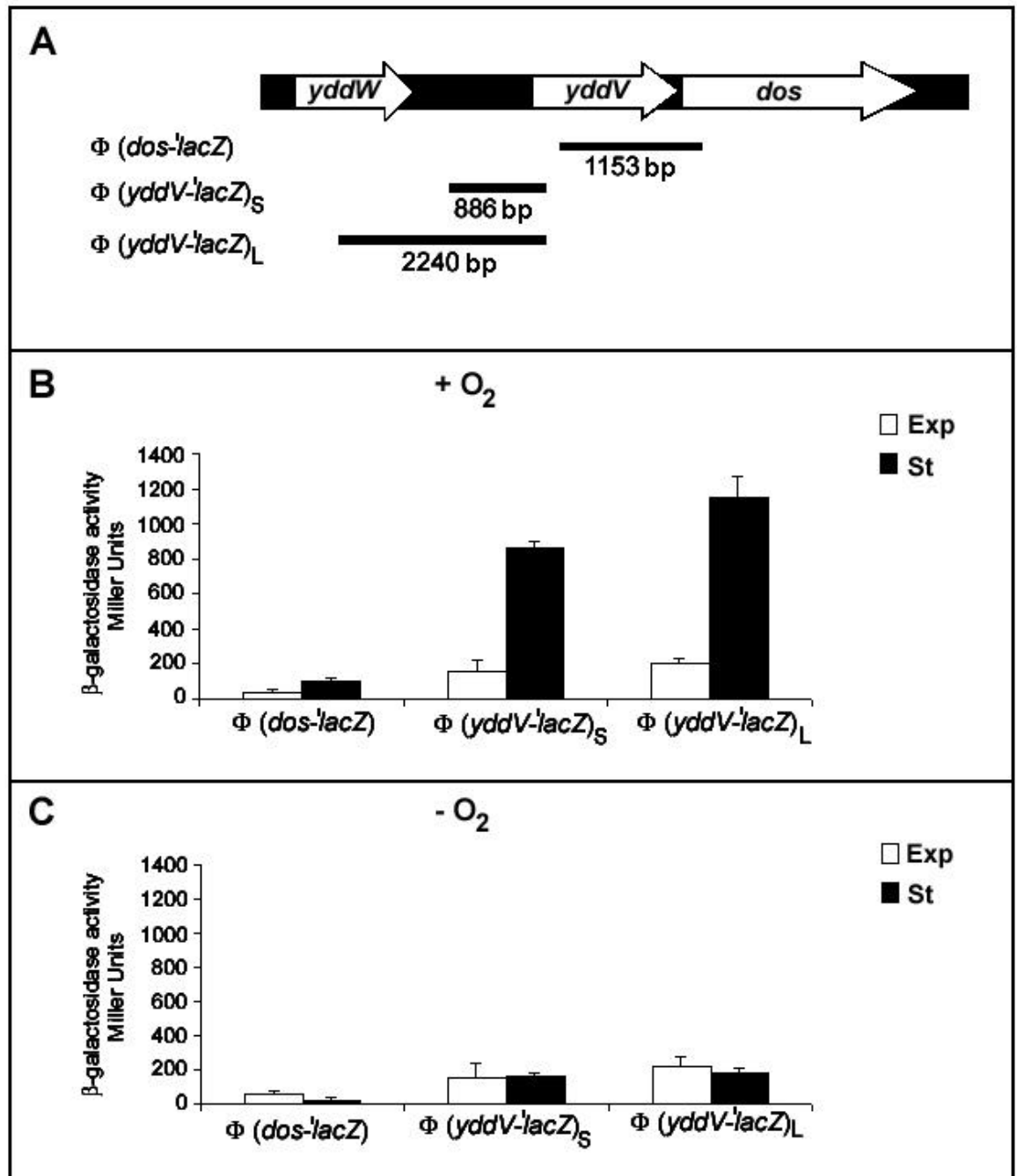


Figure 2. Méndez-Ortiz *et al.*

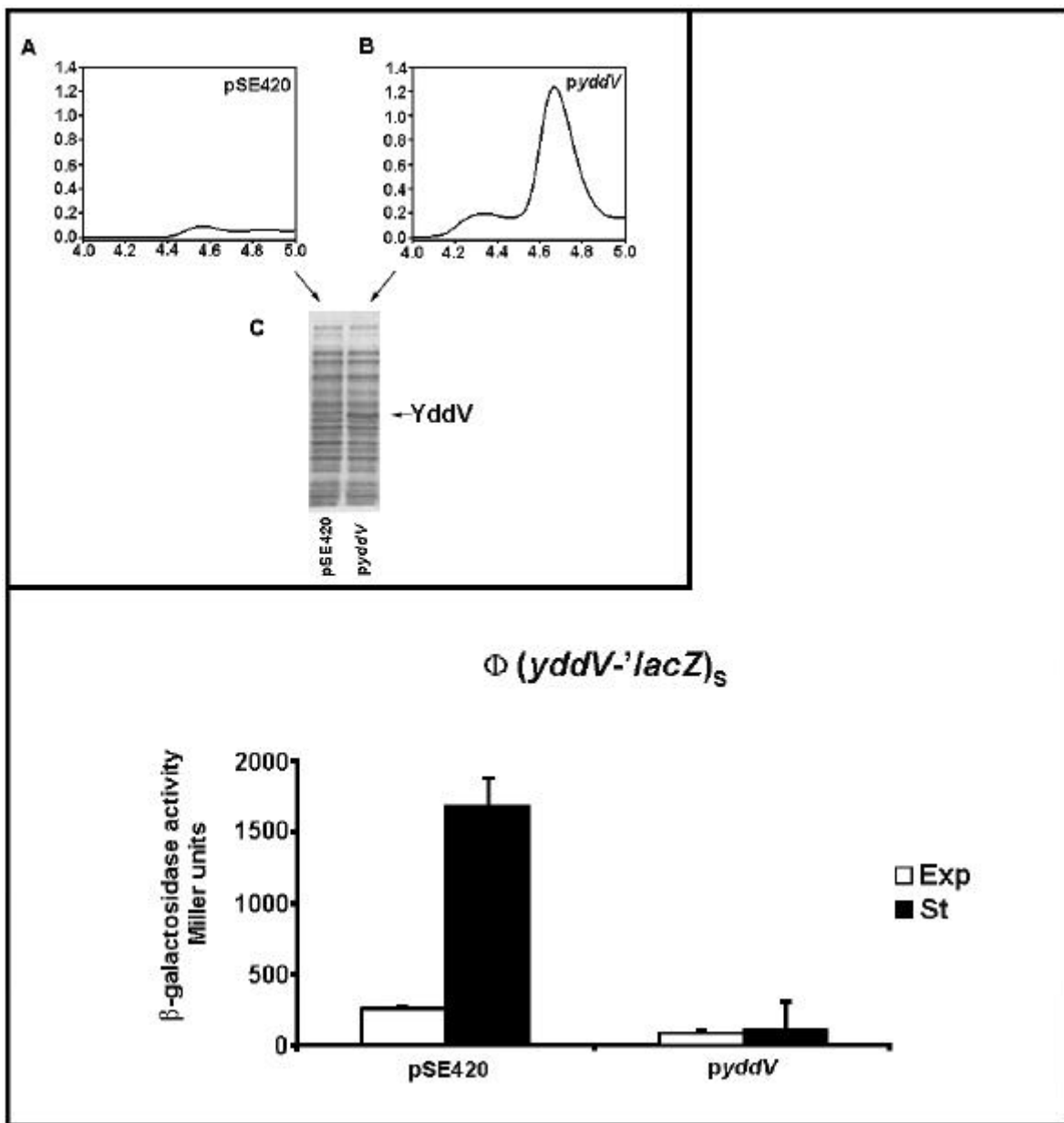


Figure 3. Méndez-Ortiz *et al.*

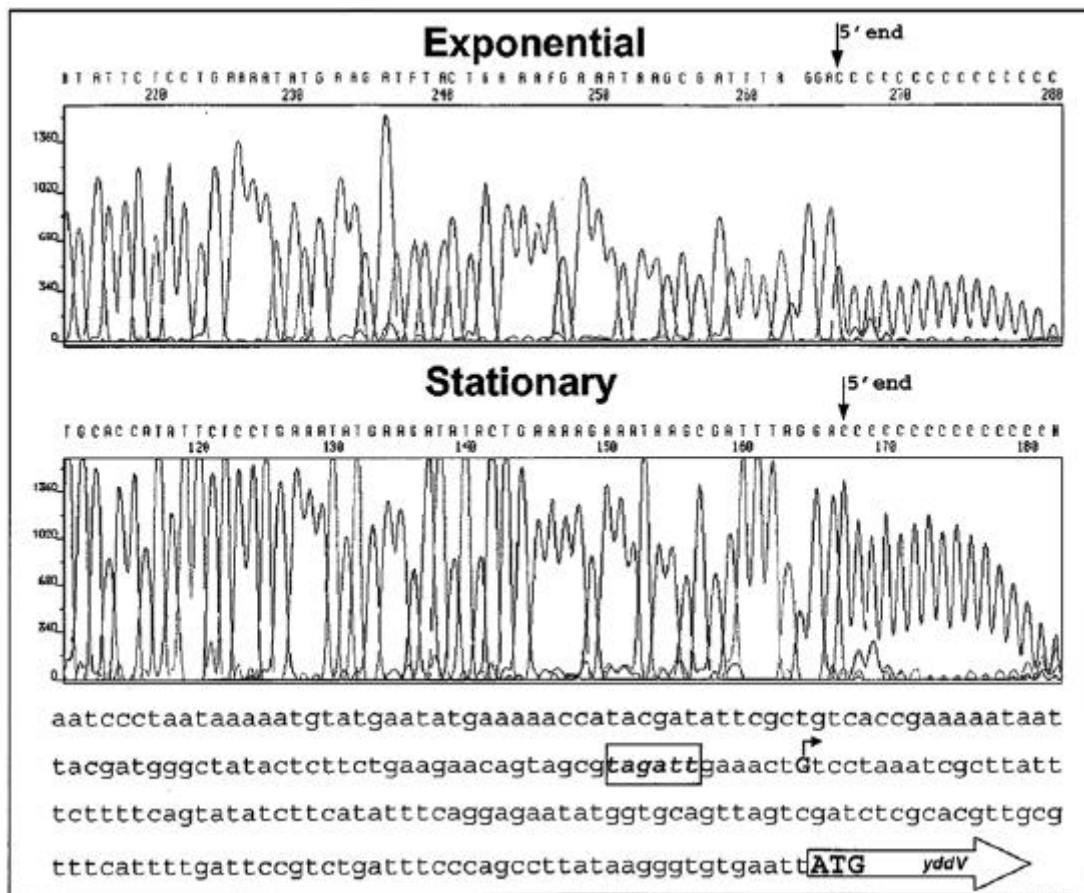


Figure 4. Méndez-Ortiz *et al.*

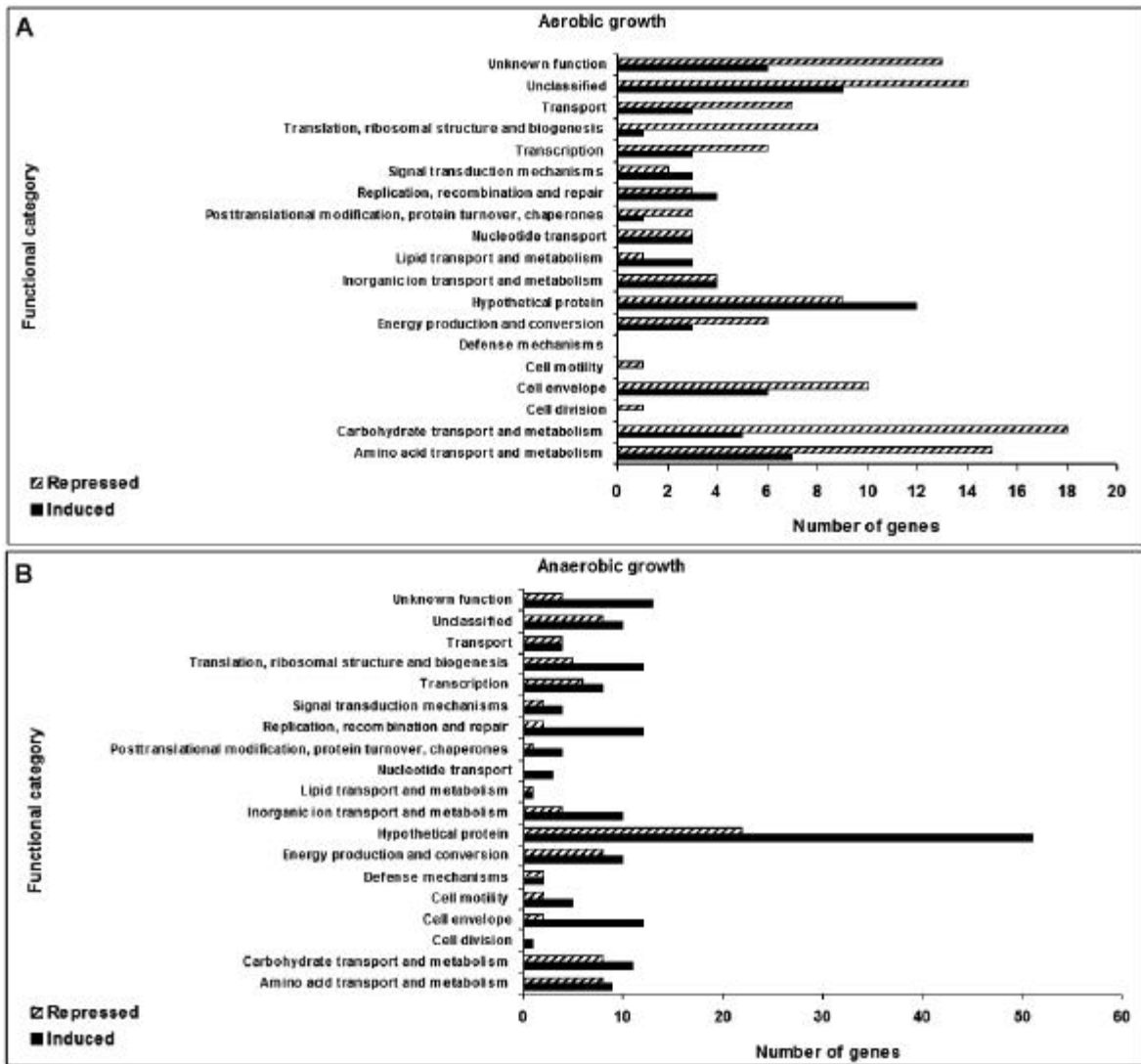


Figure 5. Méndez-Ortiz *et al.*

Supplementary Material. Méndez-Ortiz *et al.*,

Table S1. Induced genes in a *DyddV*-dos::kan strain in cultures grown in aerobic conditions

Gene	b number	Induction fold	Description
<i>ygeJ</i>	b2854	23.81	conserved protein, lysozyme-like
<i>yfiO</i>	b2595	9.0	putative lipoprotein
<i>tpr</i>	b1229	8.8	a protamine-like protein
<i>acrD</i>	b2470	8.1	aminoglycoside/multidrug efflux pump (RND family)
<i>yhfR</i>	b3375	7.5	putative transcriptional repressor (GntR family)
<i>oppB</i>	b1244	7.2	oligopeptide transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>ycbO</i>	b0936	7.0	alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily, peri_bind). Putative aliphatic sulfonates binding protein
<i>yfaS</i>	b2228	7.0	putative membrane protein
<i>rstB</i>	b1609	6.8	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with RstA
<i>cysC</i>	b2750	6.7	adenosine 5'-phosphosulfate kinase
<i>yeeU</i>	b2004	6.5	unknown
<i>xdhA</i>	b2866	6.4	putative xanthine dehydrogenase subunit, molybdenum cofactor-binding domain
<i>yqjK</i>	b3100	6.2	hypothetical protein
<i>prsA</i>	b1207	6.0	phosphoribosylpyrophosphate synthetase
<i>kdgT</i>	b3909	5.9	2-keto-3-deoxy-D-gluconate transport protein (KDGT family)
<i>ybbd</i>	b0500	5.8	hypothetical protein
<i>oxyR</i>	b3961	5.8	transcriptional regulator of oxidative stress, regulates intracellular hydrogen peroxide (LysR family)
<i>pspF</i>	b1303	5.8	transcriptional activator of phage shock (EBP family)
<i>yohF</i>	b2137	5.8	putative oxidoreductase
<i>tesB</i>	b0452	5.7	acyl-CoA thioesterase II
<i>insA</i>	b4294	5.6	KpLE2 phage-like element; IS1 protein InsA
<i>Int</i>	b0657	5.5	apolipoprotein N-acyltransferase, copper homeostasis protein, inner membrane
<i>yigM</i>	b3827	5.4	putative transport protein
<i>hycE</i>	b2721	5.4	large subunit of hydrogenase 3 (part of FHL complex)
<i>arcA</i>	b4401	5.3	negative response regulator of genes in aerobic pathways, (sensors, ArcB and CpxA). Response regulator in two-component regulatory system with ArcB (or CpxA), regulates respiratory and fermentative metabolism (OmpR family)
<i>celB</i>	b1737	5.2	PEP-dependent phosphotransferase enzyme II for cellobiose, arbutin, and salicin. PTS family enzyme IIC, cellobiose/arbutin/salicin sugar-specific
<i>yqgE</i>	b2948	5.1	hypothetical protein
<i>yjhQ</i>	b4307	5.0	KpLE2 phage-like element; conserved protein
<i>yiaH</i>	b3561	5.0	putative membrane protein
<i>yffN</i>	b2445	4.9	CPZ-55 prophage
<i>yihI</i>	b3866	4.9	hypothetical protein
<i>allB</i>	b0512	4.8	allantoinase

<i>ydaL</i>	b1340	4.8	hypothetical protein
<i>pmrD</i>	b2259	4.8	polymyxin resistance protein B
<i>ydiB</i>	b1692	4.7	putative oxidoreductase shikimate 5-dehydrogenase, NAD(P)-binding
<i>ybgG</i>	b0732	4.7	putative sugar hydrolase
<i>glnD</i>	b0167	4.7	catalyzes the uridylylation or deuridylylation of the PII nitrogen regulatory protein
<i>yfcM</i>	b2326	4.7	putative transporting ATPase
<i>yneC</i>	b1518	4.6	hypothetical protein
<i>sdaC</i>	b2796	4.6	putative serine transport protein (HAAAP family)
<i>intA</i>	b2622	4.5	CP4-57 prophage; integrase
<i>yzzZ</i>	b1424	4.5	putative glycoprotein
<i>yfaV</i>	b2246	4.5	putative transport protein (MFS family)
<i>yjfO</i>	b3776	4.5	uncharacterized protein conserved in bacteria
<i>yfhP</i>	b2531	4.5	Fe-S cluster-containing transcription factor. Repressor of <i>iscRSUA</i> operon
<i>glnL</i>	b3870	4.4	glutamine synthetase
<i>yhcC</i>	b1209	4.4	outer membrane lipoprotein LolB precursor
<i>phoM</i>	b4398	4.4	catabolic regulation response regulator. Response regulator in two-component regulatory system with CreC, regulates catabolic regulation (OmpR family)
<i>ydbT</i>	b1394	4.4	enoyl-CoA hydratase
<i>yejM</i>	b2188	4.3	putative phosphatase/sulphatase. Putative sulfatase
<i>yrbB</i>	b3191	4.3	hypothetical protein
<i>mutD</i>	b0215	4.3	DNA polymerase III subunit epsilon
<i>nlp</i>	b3661	4.3	lipoprotein-28, possible binding protein
<i>fadD</i>	b1805	4.3	acyl-CoA synthase
<i>ygfK</i>	b2878	4.3	putative oxidoreductase, Fe-S subunit
<i>gloB</i>	b0212	4.2	putative hydroxyacylglutathione hydrolase
<i>yjfw</i>	b4197	4.2	L-xylulose 5-phosphate 3-epimerase. Putative hexulose-6- phosphate isomerase
<i>nrdA</i>	b2234	4.2	ribonucleotide-diphosphate reductase alpha subunit
<i>hofQ</i>	b3391	4.2	putative transport protein, possibly in biosynthesis of type IV pilin
<i>yhaN</i>	b4470	4.1	hypothetical protein
<i>cadB</i>	b4132	4.1	lysine/cadaverine transport protein (APC family)
<i>ylbH</i>	b0499	4.1	hypothetical protein
<i>yjhR</i>	b4308	4.1	KpLE2 phage-like element; frameshift suppressor contains phospholipase D/nuclease
<i>rfaA</i>	b2039	4.1	dTDP-glucose pyrophosphorylase. glucose-1-phosphate thymidyltransferase
<i>yejB</i>	b2178	4.1	putative oligopeptide transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>rpsE</i>	b3303	4.1	30S ribosomal protein S5
<i>yfiJ</i>	b2626	4.1	CP4-57 prophage
<i>yhaA</i>	b3115	4.0	acetate/propionate kinase
<i>yjiW</i>	b4347	4.0	LexA regulated, possible SOS response
<i>tnaA</i>	b3708	4.0	tryptophan deaminase, PLP-dependent. Tryptophanase
<i>ydfQ</i>	b1554	4.0	probable lysozyme from lambdoid prophage Qin
<i>dacD</i>	b2010	4.0	D-carboxypeptidase, penicillin-binding protein 6b. Penicillin binding protein 6b

<i>fhuE</i>	b1102	4.0	outer membrane pore protein, receptor for Fe(III)-coprogen, Fe(III)-ferrioxamine B and Fe(III)-rhodotruclic acid. Outer membrane receptor for ferric iron uptake
-------------	-------	-----	--

TABLE S2. INDUCED GENES IN A DYDDV-DOS::KAN STRAIN IN CULTURES GROWN IN ANAEROBIC CONDITIONS

Gene	b number	Induction fold	Description
<i>ygaQ</i>	b2654	18.2	hypothetical protein
<i>yahK</i>	b0325	18.0	predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding
<i>ydaC</i>	b1347	17.4	Rac prophage; predicted protein
<i>rne</i>	b1084	15.4	fused ribonucleaseE: endoribonuclease/RNA-binding protein/RNA degradosome binding protein
<i>yccZ</i>	b0983	14.7	predicted exopolysaccharide export protein
<i>yeaG</i>	b1783	14.7	conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain
<i>era</i>	b2566	14.4	GTP-binding protein Era
<i>dksA</i>	b0145	12.4	DNA-binding transcriptional regulator of rRNA transcription, DnaK suppressor protein
<i>fecA</i>	b4291	12.1	KpLE2 phage-like element; ferric citrate outer membrane transporter
<i>ptxA</i>	b4195	11.9	L-ascorbate-specific enzyme IIA component of PTS
<i>ycgB</i>	b1188	10.8	hypothetical protein
<i>yfhH</i>	b2561	10.7	hypothetical protein , predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>hlyE</i>	b1182	10.4	hemolysin E
<i>rplL</i>	b3986	10.3	50S ribosomal protein L7/L12
<i>ykfI</i>	b0245	10.0	CP4-6 prophage; toxin of the YkfI-YafW toxin-antitoxin system
<i>ptsI</i>	b2416	9.9	PEP-protein phosphotransferase of PTS system (enzyme I)
<i>cspF</i>	b1558	9.4	Qin prophage; cold shock protein
<i>ygcG</i>	b2778	9.2	hypothetical protein
<i>insH</i>	b1370	9.1	Rac prophage; IS5 transposase and trans-activator
<i>yedK</i>	b1931	8.5	hypothetical protein
<i>gph</i>	b3385	8.4	phosphoglycolate phosphatase
<i>asr</i>	b1597	8.3	acid shock protein precursor
<i>gatR</i>	b4498	8.3	pseudo
<i>ybaQ</i>	b0483	8.1	hypothetical protein, predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>yjiQ</i>	b4339	8.1	predicted transposase
<i>yegJ</i>	b2071	8.0	hypothetical protein
<i>ygiH</i>	b3059	8.0	hypothetical protein
<i>cysW</i>	b2423	7.8	sulfate/thiosulfate transporter subunit
<i>ypdH</i>	b2387	7.7	predicted enzyme IIB component of PTS
<i>yncC</i>	b1450	7.6	predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>yhbY</i>	b3180	7.5	predicted RNA-binding protein
<i>allP</i>	b0511	7.5	predicted allantoin transporter
<i>hofG</i>	b3328	7.3	pseudopilin, cryptic, general secretion pathway
<i>smpB</i>	b2620	7.2	SsrA-binding protein
<i>frdC</i>	b4152	7.2	fumarate reductase subunit C
<i>nadC</i>	b0109	7.0	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase
<i>osmB</i>	b1283	7.0	lipoprotein
<i>htrE</i>	b0139	7.0	predicted outer membrane usher protein
<i>insN</i>	b4283	7.0	KpLE2 phage-like element; partial regulator of insertion

			element IS911B
<i>ynaE</i>	b1375	6.9	Rac prophage; predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>idnK</i>	b4268	6.9	D-gluconate kinase, thermosensitive
<i>minD</i>	b1175	6.9	membrane ATPase of the MinC-MinD-MinE system
<i>ygdP</i>	b2830	6.9	dinucleoside polyphosphate hydrolase
<i>nth</i>	b1633	6.8	DNA glycosylase and apyrimidinic (AP) lyase (endonuclease III)
<i>hyfA</i>	b2481	6.8	hydrogenase 4, 4Fe-4S subunit
<i>ybjX</i>	b0877	6.7	hypothetical protein
<i>zraS</i>	b4003	6.7	sensory histidine kinase in two-component regulatory system with ZraR
<i>hyiV</i>	b3514	6.6	multidrug transporter, RpoS-dependent
<i>ygcE</i>	b2776	6.6	predicted kinase
<i>yqeK</i>	b2849	6.6	hypothetical protein
<i>ymlL</i>	b1147	6.4	e14 prophage; predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>purF</i>	b2312	6.4	amidophosphoribosyltransferase
<i>gtrA</i>	b1210	6.4	glutamyl-tRNA reductase
<i>ydjY</i>	b1751	6.4	hypothetical protein
<i>yqiC</i>	b3042	6.4	hypothetical protein
<i>ybbV</i>	b0510	6.3	hypothetical protein
<i>potC</i>	b1124	6.3	spermidine/putrescine ABC transporter membrane protein
<i>yeeP</i>	b1999	6.3	CP4-44 prophage; predicted GTP-binding protein, pseudogene
<i>ydaY</i>	b1366	6.3	Rac prophage; predicted protein
<i>rob</i>	b4396	6.2	DNA-binding transcriptional activator
<i>hybB</i>	b2995	6.2	predicted hydrogenase 2 cytochrome b type component
<i>ompT</i>	b0565	6.2	DLP12 prophage; outer membrane protease VII (outer membrane protein 3b)
<i>csgB</i>	b1041	6.2	curlin nucleator protein, minor subunit in curli complex
<i>yjjA</i>	b4360	6.1	hypothetical protein
<i>yjgN</i>	b4257	6.1	conserved inner membrane protein
<i>ldcC</i>	b0186	6.1	lysine decarboxylase 2, constitutive
<i>ynfC</i>	b1585	6.1	hypothetical protein
<i>yfgG</i>	b2504	6.1	hypothetical protein
<i>yecI</i>	b1902	6.1	predicted ferritin-like protein
<i>dcuR</i>	b4124	6.0	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with DcuS
<i>rhsA</i>	b3593	6.0	rhsA element core protein RshA
<i>srlA</i>	b2702	6.0	glucitol/sorbitol-specific enzyme IIC component of PTS
<i>rpsT</i>	b0023	6.0	30S ribosomal protein S20
<i>ygeN</i>	b2858	6.0	hypothetical protein
<i>nuoI</i>	b2281	6.0	NADH dehydrogenase subunit I
<i>yaaI</i>	b0013	5.9	hypothetical protein
<i>xseB</i>	b0422	5.9	exodeoxyribonuclease VII small subunit
<i>ybfM</i>	b0681	5.9	predicted outer membrane porin
<i>ydjJ</i>	b1774	5.8	predicted oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding
<i>caiT</i>	b0040	5.8	L-carnitine/gamma-butyrobetaine antiporter
<i>yjhH</i>	b4298	5.8	KpLE2 phage-like element; predicted lyase/synthase

<i>aefA</i>	b0465	5.8	fused conserved protein
<i>mscL</i>	b3291	5.7	large-conductance mechanosensitive channel
<i>yceP</i>	b1060	5.7	hypothetical protein
<i>xylF</i>	b3566	5.6	D-xylose transporter subunit
<i>yceA</i>	b1055	5.6	hypothetical protein
<i>ldhA</i>	b1380	5.6	D-lactate dehydrogenase
<i>htgA</i>	b0012	5.6	hypothetical protein
<i>ydcC</i>	b1460	5.5	hypothetical protein
<i>pinR</i>	b1374	5.5	Rac prophage; predicted site-specific recombinase
<i>insO</i>	b0257	5.5	CP4-6 prophage; partial transposase of insertion element IS911A
<i>pspF</i>	b1303	5.5	DNA-binding transcriptional activator
<i>yfhR</i>	b2534	5.5	predicted peptidase
<i>yfhR</i>	b0225	5.5	predicted toxin of the YafQ-DinJ toxin-antitoxin system
<i>celB</i>	b1737	5.5	N,N'-diacetylchitobiose-specific enzyme IIC component of PTS
<i>yibI</i>	b3598	5.4	predicted inner membrane protein
<i>yhbG</i>	b3201	5.4	predicted transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily
<i>yfgI</i>	b2506	5.4	hypothetical protein
<i>yjhP</i>	b4306	5.4	KpLE2 phage-like element; predicted methyltransferase
<i>yncE</i>	b1452	5.4	hypothetical protein
<i>rpmG</i>	b3636	5.4	50S ribosomal protein L33
<i>allD</i>	b0517	5.3	ureidoglycolate dehydrogenase
<i>yaeR</i>	b0187	5.3	predicted lyase
<i>ydcH</i>	b1426	5.3	hypothetical protein
<i>hybA</i>	b2996	5.3	hydrogenase 2 4Fe-4S ferredoxin-type component
<i>purC</i>	b2476	5.3	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
<i>insD</i>	b1578	5.3	Qin prophage; IS2 insertion element transposase InsAB', C-ter fragment (pseudogene)
<i>yacH</i>	b0117	5.2	hypothetical protein
<i>ebgC</i>	b3077	5.2	cryptic beta-D-galactosidase, beta subunit
<i>ygdI</i>	b2809	5.2	hypothetical protein
<i>rmf</i>	b0953	5.1	ribosome modulation factor
<i>map</i>	b0168	5.1	methionine aminopeptidase
<i>thiH</i>	b3990	5.1	thiamine biosynthesis protein ThiH
<i>ispB</i>	b3187	5.1	octaprenyl diphosphate synthase
<i>ydhO</i>	b1655	5.1	predicted lipoprotein
<i>yjiY</i>	b4402	5.1	hypothetical protein
<i>yqiD</i>	b3098	5.0	hypothetical protein
<i>smtA</i>	b0921	5.0	predicted S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
<i>kdpE</i>	b0694	5.0	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with KdpD
<i>yfeC</i>	b2398	5.0	predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>ydfC</i>	b1573	5.0	Qin prophage; predicted protein
<i>yhbQ</i>	b3155	5.0	hypothetical protein
<i>hyfI</i>	b2489	5.0	hydrogenase 4, Fe-S subunit
<i>phnM</i>	b4095	5.0	carbon-phosphorus lyase complex subunit
<i>yahM</i>	b0327	5.0	hypothetical protein

<i>ydiZ</i>	b1724	5.0	hypothetical protein
<i>treC</i>	b4239	5.0	trehalose-6-P hydrolase
<i>bcp</i>	b2480	5.0	thioredoxin-dependent thiol peroxidase
<i>afuB</i>	b0263	4.9	CP4-6 prophage; predicted ferric transporter subunit
<i>proC</i>	b0386	4.9	pyrroline-5-carboxylate reductase
<i>flxA</i>	b1566	4.9	Qin prophage; predicted protein
<i>hybG</i>	b2990	4.9	hydrogenase 2 accessory protein
<i>ycdZ</i>	b1036	4.9	predicted inner membrane protein
<i>relE</i>	b1563	4.9	Qin prophage; toxin of the RelE-RelB toxin-antitoxin system
<i>metN</i>	b0199	4.9	DL-methionine transporter subunit
<i>yhcD</i>	b3216	4.9	predicted outer membrane protein
<i>thiF</i>	b3992	4.8	thiamine biosynthesis protein ThiF
<i>ykiB</i>	b0370	4.8	hypothetical protein
<i>ilvC</i>	b3774	4.8	ketol-acid reductoisomerase
<i>yfaO</i>	b2255	4.8	predicted hydrolase
<i>hcaB</i>	b2541	4.8	2,3-dihydroxy-2,3-dihydrophenylpropionate dehydrogenase
<i>yaiL</i>	b0354	4.7	nucleoprotein/polynucleotide-associated enzyme
<i>uxaC</i>	b3092	4.7	glucuronate isomerase
<i>yjdC</i>	b4135	4.7	predicted transcriptional regulator
<i>metQ</i>	b0197	4.7	DL-methionine transporter subunit
<i>fhuD</i>	b0152	4.7	iron-hydroxamate transporter subunit
<i>ydbK</i>	b1378	4.7	fused predicted pyruvate-flavodoxin oxidoreductase: conserved protein/conserved protein/FeS binding protein
<i>srlR</i>	b2707	4.7	DNA-binding transcriptional repressor
<i>yrfH</i>	b3400	4.7	ribosome-associated heat shock protein Hsp15
<i>insI</i>	b0256	4.6	CP4-6 prophage; IS30 transposase
<i>cpdB</i>	b4213	4.6	bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase periplasmic precursor protein
<i>yaeT</i>	b0177	4.6	hypothetical protein
<i>ybiB</i>	b0800	4.6	hypothetical protein
<i>ycbG</i>	b0956	4.6	hypothetical protein
<i>intD</i>	b0537	4.6	DLP12 prophage; predicted integrase
<i>cadC</i>	b4133	4.6	DNA-binding transcriptional activator
<i>trmD</i>	b2607	4.6	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase
<i>torY</i>	b1873	4.5	TMAO reductase III (TorYZ), cytochrome c-type subunit
<i>cadA</i>	b4131	4.5	lysine decarboxylase 1
<i>yraI</i>	b3143	4.5	predicted periplasmic pilin chaperone
<i>plsC</i>	b3018	4.5	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
<i>yqjI</i>	b3071	4.5	predicted transcriptional regulator
<i>ybaB</i>	b0471	4.5	hypothetical protein
<i>dinD</i>	b3645	4.5	DNA-damage-inducible protein
<i>yffF</i>	b2618	4.5	hypothetical protein
<i>rnfC</i>	b1629	4.4	electron transport complex protein RnfC
<i>ycgV</i>	b1202	4.4	predicted adhesin
<i>fimI</i>	b4315	4.4	fimbrial protein involved in type 1 pilus biosynthesis
<i>sieB</i>	b1353	4.4	Rac prophage; phage superinfection exclusion protein
<i>puuA</i>	b1297	4.4	gamma-Glu-putrescine synthase
<i>ygeF</i>	b2850	4.3	hypothetical protein
<i>lar</i>	b1348	4.3	Rac prophage; restriction alleviation protein
<i>araD</i>	b0061	4.3	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase

<i>yoaC</i>	b1810	4.3	hypothetical protein
<i>dmsD</i>	b1591	4.3	twin-arginine leader-binding protein for DmsA and TorA
<i>yffL</i>	b2443	4.3	CPZ-55 prophage; predicted protein
<i>nfi</i>	b3998	4.3	endonuclease V
<i>yihO</i>	b3876	4.3	predicted transporter
<i>pyrL</i>	b4246	4.3	pyrBI operon leader peptide
<i>tolA</i>	b0739	4.3	cell envelope integrity inner membrane protein TolA
<i>rpsC</i>	b3314	4.3	30S ribosomal protein S3
<i>ygfE</i>	b2910	4.3	protein that localizes to the cytokinetic ring
<i>yeaC</i>	b1777	4.2	hypothetical protein
<i>acrR</i>	b0464	4.2	DNA-binding transcriptional repressor
<i>yfdH</i>	b2351	4.2	CPS-53 (KpLE1) prophage; bactoprenol glucosyl transferase
<i>rfaP</i>	b3630	4.2	kinase that phosphorylates core heptose of lipopolysaccharide
<i>ykgA</i>	b0300	4.2	predicted DNA-binding transcriptional regulator
<i>yhdP</i>	b4472	4.2	conserved membrane protein, predicted transporter
<i>ydhH</i>	b1640	4.2	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase
<i>yadF</i>	b0126	4.2	carbonic anhydrase
<i>fliD</i>	b1924	4.2	flagellar capping protein
<i>groE</i>	b4142	4.2	co-chaperonin GroES
<i>acrD</i>	b2470	4.2	aminoglycoside/multidrug efflux system
<i>ybeY</i>	b0659	4.2	hypothetical protein
<i>ordL</i>	b1301	4.2	gamma-Glu-putrescine oxidase, FAD/NAD(P)-binding
<i>rlpB</i>	b0641	4.1	minor lipoprotein
<i>pheL</i>	b2598	4.1	<i>pheA</i> gene leader peptide
<i>modA</i>	b0763	4.1	molybdate transporter subunit
<i>ydbC</i>	b1406	4.1	predicted oxidoreductase, NAD(P)-binding
<i>hdeB</i>	b3509	4.1	acid-resistance protein
<i>yedI</i>	b1958	4.1	conserved inner membrane protein
<i>trmE</i>	b3706	4.1	tRNA modification GTPase
<i>yeiT</i>	b2146	4.1	predicted oxidoreductase
<i>rpmI</i>	b1717	4.1	50S ribosomal protein L35
<i>yifO</i>	b3776	4.1	hypothetical protein
<i>yhhA</i>	b3448	4.1	hypothetical protein
<i>yidK</i>	b3679	4.1	predicted transporter
<i>cspG</i>	b0990	4.0	DNA-binding transcriptional regulator
<i>gspK</i>	b3332	4.0	general secretory pathway component, cryptic
<i>yccT</i>	b0964	4.0	hypothetical protein
<i>malM</i>	b4037	4.0	maltose regulon periplasmic protein
<i>frvB</i>	b3899	4.0	fused predicted PTS enzymes: IIB component/IIC component

TABLE S3. REPRESSED GENES IN A DYDDV-DOS::KAN STRAIN IN CULTURES GROWN IN AEROBIC CONDITIONS

Gene	b number	Repression fold	Description
<i>seqA</i>	b0687	20.0	negative modulator of initiation of replication
<i>gadB</i>	b1493	15.7	glutamate decarboxylase isozyme. Glutamate decarboxylase, PLP-dependent, isozyme beta
<i>kdsA</i>	b1215	13.7	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase
<i>icl</i>	b4015	12.7	isocitrate lyase
<i>yfbE</i>	b2253	11.8	putative aminotransferase
<i>yfiA</i>	b2597	11.8	Putative yhbH sigma 54 modulator. Ribosome associated factor, stabilizes ribosomes against dissociation
<i>yccD</i>	b0999	11.2	hypothetical protein
<i>yehH</i>	b1205	10.5	hypothetical protein
<i>moaA</i>	b0781	9.8	molybdenum cofactor biosynthesis protein A
<i>hdeA</i>	b3510	9.6	unknown
<i>ubiH</i>	b2907	9.4	2-octaprenyl-6-methoxyphenyl hydroxylase
<i>yheA</i>	b3337	9.4	regulatory or redox component complexing with Bfr, in iron storage and mobility
<i>yhhD</i>	b3509	9.3	hypothetical protein
<i>nikB</i>	b3477	9.0	nickel transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>ygbE</i>	b2749	8.7	putative cytochrome oxidase subunit
<i>yebO</i>	b1825	8.7	hypothetical protein
<i>secF</i>	b0409	8.5	protein export protein SecF
<i>lacY</i>	b0343	7.8	galactoside permease (lactose permease, M protein) (MFS family)
<i>leuL</i>	b0075	7.7	<i>leu</i> operon leader peptide
<i>dasC</i>	b3781	7.6	thioredoxin
<i>ygiZ</i>	b3027	7.5	hypothetical protein
<i>yhhZ</i>	b3442	7.5	hypothetical protein
<i>ycdX</i>	b1034	7.3	hypothetical protein
<i>idnT</i>	b4265	7.2	L-idonate transport protein (GntP family)
<i>pqqL</i>	b1494	7.2	putative zinc protease. Redox cofactor for pyrroloquinoline quinone synthesis (cryptic in K-12)
<i>pflB</i>	b0903	7.1	pyruvate formate lyase I, induced anaerobically
<i>ycaI</i>	b0913	7.0	putative recombination protein, metallo-hydrolase domain
<i>entA</i>	b0596	7.0	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase
<i>b0309</i>	b0309	6.9	unknown
<i>atpI</i>	b3739	6.9	ATP synthase subunit I
<i>yccJ</i>	b1003	6.8	unknown
<i>rmf</i>	b0953	6.7	ribosome modulation factor
<i>ymgE</i>	b1195	6.6	transglycosylase associated protein
<i>ygcA</i>	b2785	6.6	23S rRNA (uracil-5-)-methyltransferase
<i>pgpB</i>	b1278	6.6	Non-essential phosphatidylglycerophosphate phosphatase, membrane bound. Phosphatidylglycerophosphate phosphatase B
<i>serS</i>	b0893	6.6	seryl-tRNA synthetase
<i>frdD</i>	b4151	6.4	fumarate reductase subunit D
<i>shiA</i>	b1981	6.1	Shikimate and dehydroshikimate transport protein (MFS family). Shikimate transporter

<i>cpxA</i>	b3911	6.1	two-component sensor protein
<i>potI</i>	b0857	6.1	putrescine transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>b1364</i>	b1364	5.8	Rac prophage
<i>fliR</i>	b1950	5.8	flagellar biosynthesis protein
<i>ynaJ</i>	b1332	5.8	hypothetical protein
<i>ycfH</i>	b1100	5.8	putative hydrolase
<i>pepT</i>	b1127	5.7	peptidase T
<i>gltA</i>	b0720	5.7	citrate synthase
<i>ccmC</i>	b2199	5.7	heme export protein (ABC superfamily, membrane)
<i>glgA</i>	b3429	5.7	glycogen synthase
<i>alkA</i>	b2068	5.6	hypothetical protein
<i>argD</i>	b1748	5.6	bifunctional N-succinyldiaminopimelate-aminotransferase/acetylornithine transaminase protein
<i>codA</i>	b0337	5.6	cytosine deaminase
<i>artQ</i>	b0862	5.6	arginine 3rd transport system permease protein (ABC superfamily, membrane)
<i>uspB</i>	b3494	5.6	universal stress protein UspB
<i>ydgK</i>	b1626	5.5	putative oxidoreductase
<i>yjhI</i>	b4299	5.5	KpLE2 phage-like element; putative transcriptional repressor (IcIR family)
<i>cspE</i>	b0623	5.4	cold shock protein E
<i>dsbB</i>	b1185	5.4	disulfide bond formation protein B
<i>rplN</i>	b3310	5.3	50S ribosomal protein L14
<i>b1085</i>	b1085	5.3	unknown
<i>galR</i>	b2837	5.3	repressor of galETK operon. Transcriptional repressor for galactose utilization (GalR/LacI family)
<i>gltK</i>	b0653	5.3	glutamate/aspartate transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>adiY</i>	b4116	5.2	putative ARAC-type regulatory protein. Transcriptional activator of the arginine decarboxylase system (AraC/XylS family)
<i>pdxY</i>	b1636	5.1	pyridoxine kinase
<i>eno</i>	b2779	5.1	phosphopyruvate hydratase
<i>ydhR</i>	b1667	5.1	protein of unknown function. ydhR likely belongs to a recently identified group of mono-oxygenase proteins
<i>yfaA</i>	b2230	5.1	hypothetical protein
<i>kch</i>	b1250	5.0	putative potassium channel protein (VIC family)
<i>yedN</i>	b4495	5.0	hypothetical protein
<i>yaeR</i>	b0187	5.0	putative enzyme
<i>ompC</i>	b2215	5.0	outer membrane pore protein
<i>ugpA</i>	b3452	5.0	sn-glycerol 3-phosphate transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>yedE</i>	b1929	4.9	putative transport system permease protein
<i>fmt</i>	b3288	4.9	methionyl-tRNA formyltransferase
<i>mreD</i>	b3249	4.9	rod shape-determining protein
<i>yadH</i>	b0128	4.9	putative transport protein (ABC superfamily, membrane)
<i>araJ</i>	b0396	4.8	arabinose polymer transport protein (MFS family). Involved in either transport or processing of arabinose polymers
<i>yneE</i>	b1520	4.8	hypothetical protein
<i>ompA</i>	b0957	4.8	outer membrane protein
<i>lysP</i>	b2156	4.8	lysine-specific permease (APC family)

<i>ybhT</i>	b0762	4.8	unknown
<i>ybfB</i>	b0702	4.8	hypothetical protein
<i>oppF</i>	b1247	4.7	homolog of Salmonella ATP-binding protein of oligopeptide ABC transport system
<i>yeiG</i>	b2154	4.7	putative esterase
<i>ybbY</i>	b0513	4.7	possible uracil transporter. Putative transport protein
<i>agaD</i>	b3140	4.6	PTS system, N-acetylglucosamine enzyme IID component 1
<i>rpiA</i>	b2914	4.6	ribose-5-phosphate isomerase A
<i>gadC</i>	b1492	4.6	putative glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter (APC family)
<i>rplE</i>	b3308	4.6	50S ribosomal protein L5
<i>gadE</i>	b3512	4.5	putative regulator
<i>rhaT</i>	b3907	4.4	L-rhamnose:H ⁺ symporter (DMT superfamily)
<i>yidH</i>	b3676	4.4	hypothetical protein
<i>yfeZ</i>	b2433	4.4	hypothetical protein
<i>uspA</i>	b3495	4.4	universal stress protein A
<i>leuA</i>	b0074	4.4	2-isopropylmalate synthase
<i>pfkB</i>	b1723	4.4	6-phosphofructokinase II; suppressor of <i>pfkA</i>
<i>hemD</i>	b3804	4.3	uroporphyrinogen-III synthetase
<i>yggT</i>	b2952	4.3	hypothetical protein
<i>yfiK</i>	b2578	4.3	putative transport protein
<i>lsrA</i>	b1513	4.3	putative ATP-binding component of a transport system; essential for aerobic growth. Putative sugar transport protein (ABC superfamily, <i>atp_bind</i>)
<i>cfa</i>	b1661	4.3	cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase. Cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase (unsaturated-phospholipid methyltransferase)
<i>yegN</i>	b2536	4.2	multidrug transport protein (RND family)
<i>hcaT</i>	b3087	4.2	MFS (major facilitator superfamily) transporter. Putative 3-phenylpropionic acid transport protein (MFS family)
<i>ygiR</i>	b1965	4.2	putative NAD(P)-binding dehydrogenase
<i>yjeP</i>	b4159	4.2	putative periplasmic binding protein
<i>ptsG</i>	b1101	4.2	PTS family enzyme IIC (N-terminal); enzyme IIB (C-terminal), glucose-specific
<i>ebgA</i>	b3076	4.2	evolved beta-D-galactosidase, alpha subunit; cryptic gene
<i>cyoD</i>	b0429	4.2	cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit IV
<i>rpiR</i>	b4089	4.2	transcriptional repressor of ribose catabolism (RpiR/YebK family)
<i>yeiM</i>	b2164	4.2	putative transport protein (NUP family)
<i>citT</i>	b0612	4.2	citrate:succinate antiporter (DASS family)
<i>yjiO</i>	b4337	4.1	multidrug transport protein (MFS family)
<i>ybiR</i>	b0818	4.1	putative transport protein
<i>yieO</i>	b3754	4.1	putative transport protein (MFS family)
<i>cutF</i>	b0192	4.1	copper homeostasis protein (lipoprotein)
<i>ynaI</i>	b1330	4.1	putative transmembrane protein
<i>yciB</i>	b1254	4.0	putative intracellular septation protein
<i>yhiM</i>	b3491	4.0	putative transport protein
<i>pgk</i>	b2926	4.0	phosphoglycerate kinase
<i>sgaH</i>	b4196	4.0	3-keto-L-gulonate 6-phosphate decarboxylase. Probable hexulose-6-phosphate synthase
<i>def</i>	b3287	4.0	peptide deformylase

yqeG b2845 4.0 putative transport protein (HAAAP family)

TABLE S4. REPRESSED GENES IN A DYDDV-DOS::KAN STRAIN IN CULTURES GROWN IN ANAEROBIC CONDITIONS

Gene	b number	Repression fold	Description
<i>rffT</i>	b3793	14.4	putative enterobacterial common antigen polymerase
<i>gadE</i>	b3512	10.2	DNA-binding transcriptional activator
<i>serS</i>	b0893	9.6	seryl-tRNA synthetase
<i>yhaH</i>	b3103	9.4	predicted inner membrane protein
<i>yidH</i>	b3676	9.2	conserved inner membrane protein
<i>ulaB</i>	b4194	9.0	L-ascorbate-specific enzyme IIB component of PTS
<i>kdsA</i>	b1215	8.7	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase
<i>ydbH</i>	b1381	8.5	hypothetical protein
<i>fecB</i>	b4290	8.5	KpLE2 phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
<i>hybC</i>	b2994	7.8	hydrogenase 2, large subunit
<i>mgtA</i>	b4242	7.7	magnesium transporter
<i>rarD</i>	b3819	7.5	hypothetical protein. predicted chloramphenicol resistance permease
<i>yfeZ</i>	b2433	7.3	hypothetical protein, predicted inner membrane protein
<i>rpoA</i>	b3295	6.9	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
<i>mtlR</i>	b3601	6.8	DNA-binding repressor
<i>gadB</i>	b1493	6.8	glutamate decarboxylase B, PLP-dependent
<i>wza</i>	b2062	6.4	lipoprotein required for capsular polysaccharide translocation through the outer membrane
<i>rnfE</i>	b1632	6.4	NADH-ubiquinone oxidoreductase
<i>secF</i>	b0409	6.3	protein export protein SecF
<i>mdtB</i>	b2075	5.9	multidrug efflux system, subunit B
<i>cydA</i>	b0733	5.8	cytochrome d terminal oxidase, subunit I
<i>rttF</i>	b4481	5.7	4-alpha-L-fucosyltransferase
<i>phnE</i>	b4104	5.6	phosphonate/organophosphate ester transporter subunit
<i>setB</i>	b2170	5.5	lactose/glucose efflux system
<i>cobT</i>	b1991		nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase
<i>ygfX</i>	b2896	5.4	hypothetical protein
<i>yoal</i>	b1788	5.4	hypothetical protein
<i>hemD</i>	b3804	5.4	uroporphyrinogen-III synthetase
<i>ygbE</i>	b2749	5.4	conserved inner membrane protein
<i>uxaA</i>	b3091	5.3	altronate hydrolase
<i>cheB</i>	b1883	5.2	chemotaxis-specific methyltransferase
<i>kdpB</i>	b0697	5.2	potassium-transporting ATPase subunit B
<i>rplF</i>	b3305	5.2	50S ribosomal protein L6
<i>ytfL</i>	b4218	5.1	predicted inner membrane protein
<i>ybdJ</i>	b0580	5.1	hypothetical protein, predicted inner membrane protein
<i>glgC</i>	b3430	5.0	glucose-1-phosphate adenylyltransferase
<i>nlpI</i>	b3163	5.0	hypothetical protein
<i>potI</i>	b0857	5.0	putrescine transporter subunit: membrane component of ABC superfamily
<i>cpxA</i>	b3911	5.0	two-component sensor protein
<i>yedE</i>	b1929	5.0	predicted inner membrane protein
<i>yhjC</i>	b3521	4.9	predicted DNA-binding transcriptional regulator

<i>yhfX</i>	b3381	4.9	predicted amino acid racemase
<i>yedA</i>	b1959	4.9	predicted inner membrane protein
<i>cycA</i>	b4208	4.8	D-alanine/D-serine/glycine transporter
<i>yqfA</i>	b2899	4.8	predicted oxidoreductase, inner membrane subunit
<i>ynfB</i>	b1583	4.8	hypothetical protein
<i>yigA</i>	b3810	4.8	hypothetical protein
<i>fimC</i>	b4316	4.8	chaperone, periplasmic
<i>atpF</i>	b3736	4.8	ATP synthase subunit B
<i>yfcJ</i>	b2322	4.7	predicted transporter
<i>ubiH</i>	b2907	4.7	2-octaprenyl-6-methoxyphenyl hydroxylase
<i>hycC</i>	b2723	4.7	NADH dehydrogenase subunit N
<i>yqeG</i>	b2845	4.6	predicted transporter
<i>dcuB</i>	b4123	4.6	C4-dicarboxylate antiporter
<i>yhjW</i>	b3546	4.6	predicted metal dependent hydrolase
<i>rpsK</i>	b3297	4.6	30S ribosomal protein S11
<i>yccW</i>	b0967	4.5	predicted methyltransferase
<i>yceL</i>	b1065	4.5	predicted drug efflux system
<i>uspB</i>	b3494	4.5	universal stress protein UspB
<i>pepQ</i>	b3847	4.5	proline dipeptidase
<i>yehH</i>	b2158	4.4	conserved inner membrane protein
<i>exuR</i>	b3094	4.4	DNA-binding transcriptional repressor
<i>sgcX</i>	b4305	4.4	KpLE2 phage-like element; predicted endoglucanase with Zn-dependent exopeptidase domain
<i>rpsH</i>	b3306	4.4	30S ribosomal protein S8
<i>rpmD</i>	b3302	4.4	50S ribosomal protein L30
<i>acrB</i>	b0462	4.4	multidrug efflux system protein
<i>srlE</i>	b2703	4.3	glucitol/sorbitol-specific enzyme IIB component of PTS
<i>ydfD</i>	b1576	4.3	Qin prophage; predicted protein
<i>ybdN</i>	b0602	4.3	hypothetical protein
<i>yiaI</i>	b3573	4.3	predicted hydrogenase, 4Fe-4S ferredoxin-type component
<i>ygiZ</i>	b3027	4.3	conserved inner membrane protein
<i>iciA</i>	b2916	4.3	chromosome replication initiation inhibitor protein
<i>alkA</i>	b2068	4.3	3-methyl-adenine DNA glycosylase II
<i>chpB</i>	b4225	4.3	toxin of the ChpB-ChpS toxin-antitoxin system
<i>ybiC</i>	b0801	4.3	predicted dehydrogenase
<i>farR</i>	b0703	4.3	DNA-binding transcriptional dual regulator, fatty-acyl-binding
<i>yncJ</i>	b1436	4.2	hypothetical protein
<i>fecD</i>	b4288	4.2	KpLE2 phage-like element; iron-dicitrate transporter subunit
<i>ccmC</i>	b2199	4.2	heme exporter subunit
<i>cysG</i>	b3368	4.1	fused siroheme synthase 1,3-dimethyluroporphyriongen III dehydrogenase and siroheme ferrochelatase/uroporphyrinogen methyltransferase
<i>yhhH</i>	b3483	4.1	hypothetical protein
<i>yjiK</i>	b4333	4.1	hypothetical protein
<i>atpE</i>	b3737	4.1	ATP synthase subunit C
<i>prpE</i>	b0335	4.1	predicted propionyl-CoA synthetase with ATPase domain
<i>brnQ</i>	b0401	4.1	predicted branched chain amino acid transporter (LIV-II)
<i>yhiM</i>	b3491	4.1	conserved inner membrane protein
<i>yhaO</i>	b3110	4.1	predicted transporter

<i>ugpE</i>	b3451	4.1	glycerol-3-phosphate transporter subunit
<i>ycfH</i>	b1100	4.0	predicted metallodependent hydrolase
<i>artQ</i>	b0862	4.0	arginine transporter subunit
<i>ymbD</i>	b1045	4.0	hypothetical protein
<i>yigN</i>	b3832	4.0	predicted recombination limiting protein

ANEXO 3

MECANISMOS MOLECULARES DE LA SÍNTESIS DE CELULOSA EN BACTERIAS

Micaela Marcela Méndez-Ortiz y Jorge Membrillo-Hernández

Lab. de Microbiología y Genética Molecular, Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apdo. Postal 70-228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510. México, D.F. E-mail: marcela@correo.unam.mx, jmh@biomedicas.unam.mx

RESUMEN

La celulosa ($C_6H_{10}O_5$) es un biopolímero de gran interés biotecnológico. El presente trabajo ofrece una revisión breve de los aspectos más relevantes que conciernen a los determinantes genéticos y moleculares involucrados en la síntesis de celulosa en bacterias. El análisis de los genes de *Acetobacter xylinum* involucrados en la síntesis de celulosa ha permitido la identificación de varias especies bacterianas capaces de producir celulosa, así como la elucidación de mecanismos biosintéticos que involucran a la molécula reguladora c-di-GMP, sintetizada por proteínas que poseen dominios GGDEF, las cuales están ampliamente distribuidas entre las bacterias.

Palabras Clave: Celulosa sintasa, c-di-GMP, diguanilato ciclasa, dominios GGDEF, fosfodiesterasa.

ABSTRACT

Cellulose ($C_6H_{10}O_5$) is a biopolymer of wide biotechnological interest. The present work offers a short review about some aspects of cellulose biosynthesis, its relevance and physiological function. The analyses of genes involved in cellulose biosynthesis from *Acetobacter xylinum* have led to the identification of other bacteria with the ability to produce cellulose and to the involvement of the regulatory molecule c-di-GMP, which is synthesized by the broadly distributed proteins possessing GGDEF domains.

Key Words: Cellulose synthase, c-di-GMP, diguanilate cyclase, GGDEF domains, phosphodiesterase.

INTRODUCCIÓN

La celulosa es un biopolímero lineal de unidades β -(1,4)-D-glucopiranosas y es un componente estructural intrínseco de la pared celular de las plantas (en forma de microfibrillas de 2 a 20 nm de diámetro y de 100 a 40,000 nm de largo) que forma una red con otros polímeros de carbohidratos (Fig. 1)¹⁻³. Es la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza de amplio interés biológico ya que es indispensable como materia prima de madera, papel y en la industria textil. La producción de celulosa se ha considerado propia de organismos del reino de las plantas, sin embargo, el análisis de los mecanismos y rutas biosintéticas para la producción de celulosa se basa principalmente en investigaciones realizadas en bacterias. Los estudios para la descripción molecular de estos procesos han sido realizados principalmente en *Acetobacter xylinum*, una bacteria productora de celulosa en la que se han identificado a los genes cuyos productos son

requeridos en la síntesis de celulosa y el análisis de proteínas homólogas a las de *A. xylinum*. Estos estudios han permitido la identificación de otras especies productoras de celulosa, como las enterobacterias, lo cual permite el empleo de múltiples herramientas moleculares bien establecidas para la descripción de las rutas biosintéticas y regulatorias en la producción de celulosa⁴⁻⁸. A continuación, se hará una descripción de los procesos moleculares requeridos para la síntesis de celulosa en *A. xylinum* y otras bacterias.

SÍNTESIS DE CELULOSA EN BACTERIAS

Acetobacter xylinum

Algunas bacterias producen celulosa (llamada también biocelulosa o celulosa bacteriana)^{9,10}. La celulosa de plantas y la celulosa de bacterias tienen la misma estructura química, pero diferentes propiedades fisicoquímicas¹¹. Las bacterias generalmente producen celulosa como un componente extracelular para protección de agentes mecánicos y químicos, así como para facilitar la adhesión de células a tejidos

Nota: Artículo recibido el 05 de octubre del 2003 y aceptado el 25 de mayo del 2004.

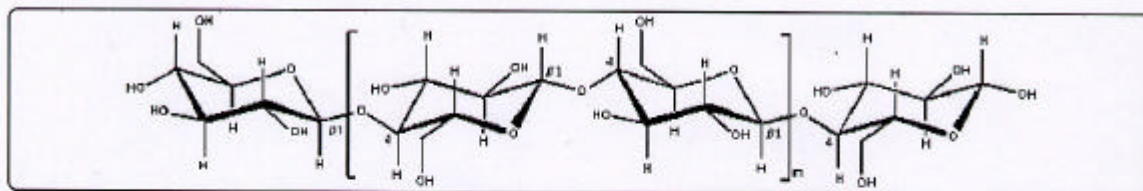


Figura 1. Estructura de la celulosa.

huéspedes¹²⁻¹⁵. *Acetobacter xylinum* ha sido el modelo para el estudio de síntesis de celulosa bacteriana, ya que produce celulosa pura como producto extracelular^{4,16}. La vía metabólica para la síntesis de celulosa consiste en lo siguiente: La glucosa es transportada a través de la membrana bacteriana por la glucosa permeasa y fosforilada por la glucosa cinasa para formar glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es isomerizada por la fosfoglucomutasa a glucosa-1-fosfato la cual es transformada a glucosa uridina-5'-difosfato (UDP-Glucosa) por la UDPG pirofosforilasa. Finalmente, la UDP-Glucosa es polimerizada a celulosa por acción de la celulosa sintasa (CS; Fig. 2)^{1,2,17}.

La CS se encuentra en asociación con la proteína de unión a c-di-GMP (denominada CDGBP) la cual tiene afinidad por el ácido cíclico bis-(2',5')-diguánico (c-di-GMP) que es un activador alostérico reversible que regula la actividad de la CS¹⁸. El análisis de la localización celular de la CS y la CDGBP sugiere que ambas proteínas se encuentran ancladas a la membrana citoplásmica en contacto con otras dos proteínas aún no identificadas que forman un poro de estructura compleja a través del cual, las cadenas nascentes de celulosa emergen y forman cristales (Fig. 3)¹⁹.

ORGANIZACIÓN GENÉTICA

La organización de los genes involucrados en el operón de síntesis de celulosa de *A. xylinum* (operón *bcs* por las siglas en inglés *bacterial cellulose synthesis*) fue inicialmente descrita a través del aislamiento de mutantes deficientes en síntesis de celulosa (Cel⁻) de las cepa 1306 y ATCC53582 de *A. xylinum*²⁰. Cuatro genes organizados en un operón (*bcsABCD*) fueron suficientes para reestablecer el fenotipo Cel⁺ y esenciales para la síntesis de celulosa *in vivo* en donde el gen *bcsA* codifica para la CS, el *bcsB* codifica para la CDGBP y los genes *bcsC* y *bcsD* no han sido caracterizados, sin embargo, se les atribuyen funciones de ensamblaje de los polímeros de glucosa para su posterior excreción al exterior de la célula^{20,21}. El análisis de mutantes Cel⁻ de *A. xylinum* permitió la identificación de un segundo gen que codifica para una celulosa sintasa (*acsAII*), el cual no es requerido para la producción de celulosa cuando las células crecen bajo condiciones de laboratorio²².

EL REGULADOR C-DI-GMP

La enzima diguanilato ciclasa (DGC) sintetiza el c-di-GMP

a partir de dos moléculas de trifosfato de guanidina (GTP; Fig. 3). La hidrólisis al dinucleótido lineal pGpG está a cargo de una fosfodiesterasa membranal (PDEA1; Fig. 3)²³. De tal forma que el c-di-GMP generado por la diguanilato ciclasa se une principalmente a la proteína CDGBP, evitando así, la degradación por PDEA1 (Fig. 3). La velocidad del proceso de polimerización está dada por el nivel celular de c-di-GMP libre, el cual está regulado por la concentración de iones K⁺ intracelulares. La asociación estructural de CDGBP con la CS, promueve la activación de la CS y por tanto, la síntesis de celulosa²⁴.

En *A. xylinum*, la concentración intracelular de c-di-GMP está mediada por la acción opuesta de las enzimas DGC y PDEA, las cuales están codificadas en tres operones independientes (Fig. 4). Cada una de las tres proteínas DGC (codificadas por los genes *cdg1*, *cdg2*, *cdg3*) y las tres proteínas PDEA (codificadas por los genes *pdeA1*, *pdeA2* y *pdeA3*), comparten homología en sus dominios estructurales. Estudios realizados en cepas

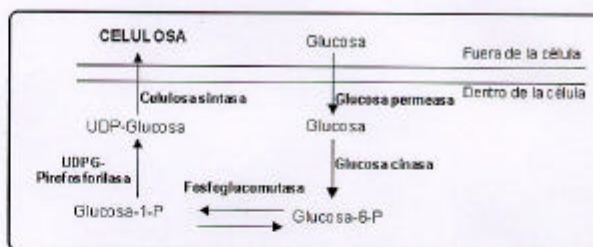
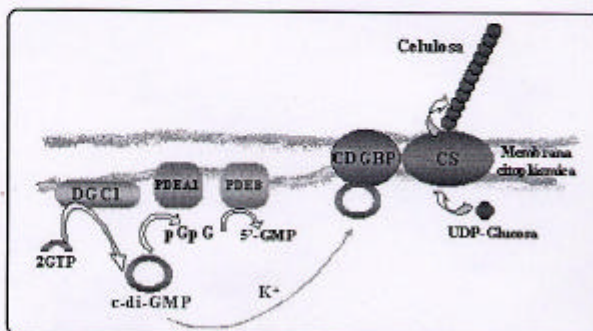


Figura 2. Reacciones involucradas en la síntesis de celulosa.

Figura 3. Modelo para la síntesis de celulosa en *A. xylinum*. DGC, diguanilato ciclasa; PDEA1, fosfodiesterasa 1; PDEB, fosfodiesterasa B; CDGBP, proteína de unión a c-di-GMP; CS, celulosa sintasa.

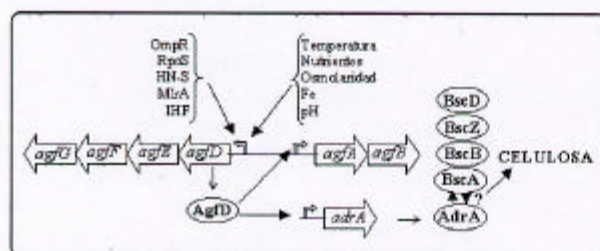


Figura 4. AgfD regula la transcripción del operón *agfAB* y el gen *adrA*. AgfD activa la síntesis de *AdrA* quien estimula la producción de celulosa quizás por unión física con la CS (celulosa sintasa).

recombinantes de mutantes en varias regiones de los tres operones, muestran que hay una jerarquía funcional en donde el operón *cdg1* es la fuente del 80% de la actividad enzimática de DGC y PDEA y los operones *cdg2* y *cdg3* contribuyen con el 15 y 5% de la actividad, respectivamente. El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, revela un alto grado de identidad estructural en cada grupo de isoenzimas. Las seis proteínas contienen los dominios GGDEF y EAL en las regiones de carboxilo terminal (C-terminal) y posibles dominios sensores en el amino terminal (N-terminal). La identificación de los dominios GGDEF y EAL compartidos por las enzimas DGC y PDEA y encontrados en numerosas proteínas bacterianas de función no definida, sugiere que ambos dominios están involucrados en mecanismos de regulación conservados, que podrían estar coordinando distintas actividades requeridas, en diversas proteínas en donde el c-di-GMP está involucrado como una molécula reguladora^{25,26}.

DOMINIOS GGDEF DE DGC Y PDEA

El dominio GGDEF está ampliamente distribuido en procariontes y fue nombrado de esta manera debido al patrón de secuencia conservada de aminoácidos GG[DE][DE]F. Un análisis de secuencias realizado mediante el programa PSI-BLAST (NCBI, Baltimore MD) para buscar homólogos de la familia GGDEF, mostró que varias bacterias contienen de 12 a 22 homólogos en su genoma. De estas homologías se dedujo que el dominio procariontico GGDEF, podría tener la función de una enzima regulatoria involucrada en la ciclización de nucleótidos, con un plegamiento similar al del dominio catalítico de las ciclasas de eucariotes^{26,27}.

Para probar la hipótesis de que los dominios GGDEF en diferentes proteínas tienen actividad de c-di-GMP sintasa, se realizaron experimentos de complementación genética, empleando tres genes diferentes que codifican para proteínas GGDEF. Los genes empleados fueron *celR2* (*Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*), *dgc1* (*Acetobacter xylinum*) y *yhcK* (*Escherichia coli*). Las proteínas codificadas por estos genes, sólo comparten el dominio GGDEF. El experimento consistió en transformar con plásmidos de expresión que acarrearan cada uno de estos genes, a una cepa mutante en *celR2* (c-di-GMP sintasa) de *R.*

leguminosarum biovar trifolii deficiente en la producción de celulosa. El resultado fue que los tres genes diferentes con el dominio GGDEF complementaron la producción de celulosa en la mutante de *R. leguminosarum biovar trifolii*. Estos datos genéticos sugieren que proteínas con el dominio GGDEF, poseen actividad de diguanilato ciclasa²⁸.

Por otro lado, considerando que *A. xylinum* es un organismo aeróbico estricto, el c-di-GMP podría actuar como una señal del estado metabólico respecto a la tensión de oxígeno, además de funcionar como un activador de la síntesis de celulosa^{24,29,30}. Debido a que la producción de celulosa facilita la formación de una película a través de la cual hay un contacto con la atmósfera, un sistema de regulación basado en la respuesta a la tensión de oxígeno podría estar operando en este proceso²⁵.

La proteína PDEA1 fue purificada y caracterizada, demostrando que presenta en su extremo N-terminal un dominio PAS con un grupo hemo, homólogo a los dominios PAS de sensores de oxígeno como la proteína FixL del género *Rhizobium*. Sin embargo, las proteínas FixL tienen en su extremo C-terminal un dominio de histidina cinasa en lugar de un dominio fosfodiesterasa. Los dominios PAS están ampliamente distribuidos en bacterias, arqueas y eucariotes y están frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales. Estos dominios tienen un plegamiento típico de cadenas $\alpha\beta$ y comparten menos del 15% de identidad de secuencias y están acoplados a actividades enzimáticas o dominios de unión a DNA. Entre las señales que detectan los dominios PAS se encuentra el oxígeno, la luz, el voltaje, el potencial redox y los hidrocarburos aromáticos, entre otras³¹.

La proteína PDEA1 de *A. xylinum* es un sensor cuya región N-terminal contiene un dominio hemo-PAS con aproximadamente 30% de identidad con la superfamilia PAS y en el extremo C-terminal comparte aproximadamente 40% de identidad con fosfodiesterasas presentes en más de 100 bacterias diferentes. Esta fosfodiesterasa es enzimáticamente menos activa bajo condiciones aeróbicas y más activa bajo condiciones anaeróbicas. La completa actividad de la enzima depende de la presencia del grupo hemo, ya que la apoenzima tiene menos del 2% de la actividad de fosfodiesterasa que la holoenzima. La actividad se recupera completamente, cuando la apoenzima se reconstituye con hemina para formar nuevamente la holoenzima.³² Como consecuencia, los niveles de c-di-GMP y celulosa se espera que incrementen en presencia de oxígeno y que decaigan en condiciones de anaerobiosis. Las bacterias del género *Acetobacter* son aerobios estrictos, así que las células ancladas a la película de celulosa están cerca de la superficie del cultivo donde tienen mayor acceso a nutrientes, así como a mayores tensiones de oxígeno para llevar a cabo la respiración. Para *A. xylinum*, la producción de celulosa es un producto costoso en términos de fuente de carbono y energía³².

SÍNTESIS DE CELULOSA EN OTRAS BACTERIAS

La regulación de la síntesis de celulosa no está limitada a *A. xylinum*. La producción de fibras de celulosa son comunes en géneros como *Acetobacter*, *Agrobacteria*, *Rhizobia* y *Enterobacteria* de los cuales se describirán los procesos biosintéticos a continuación^{6,14}.

Agrobacterium tumefaciens

A diferencia de *A. xylinum* donde las fibrillas de celulosa son sintetizadas en forma de listones que emergen de un polo de la célula y se unen para formar una película de celulosa, en *Agrobacterium tumefaciens*, las fibrillas de celulosa emergen al azar en diferentes sitios de la superficie celular^{19,24}. Estas fibrillas juegan un papel importante en la patogénesis y sirven para adherir a la bacteria a células huésped de plantas^{25,26}. En estas bacterias, la producción de celulosa está estimulada por la presencia de células o extractos de plantas²⁶. Con el fin de identificar a los genes que participan en el proceso de síntesis de celulosa se utilizaron mutantes de la cepa A1045 de *A. tumefaciens* deficientes en sintetizar celulosa⁷. El resultado de este análisis sugiere la presencia de dos operones orientados divergentemente (*celABC* y *celDE*) requeridos para la síntesis de celulosa en *A. tumefaciens*. La secuencia de aminoácidos codificada por *celA* mostró 30% de identidad y 50% de similitud con la secuencia de aminoácidos de la celulosa sintasa de *A. xylinum*²⁴. La homología fue mayor en la región media de las proteínas, sugiriendo que en esta región se localiza el sitio activo. El gen *celB* codifica para una proteína de 698 aminoácidos que contiene una región transmembranal en el extremo N-terminal, sin embargo, esta proteína no tiene homología con la proteína CDGBP de *A. xylinum*. Experimentos realizados en extractos celulares de *A. tumefaciens* de la cepa A1045, mostraron que la incorporación de c-di-GMP no estimuló la síntesis de celulosa, sin embargo, en extractos de la cepa de *A. tumefaciens* C58, sí se observó inducción de la síntesis de celulosa por c-di-GMP²⁴. Aún no es clara la diferencia en la regulación de la síntesis de celulosa en *A. tumefaciens*, pero posiblemente el mecanismo sea diferente al de *A. xylinum*²⁴. El tercer gen del operón, *celC*, codifica para una proteína de 342 aminoácidos con posibles dominios transmembranales, cuya secuencia de aminoácidos mostró una homología significativa con varias β -endoglucanasas. Mutantes en el gen *celC* son deficientes en la producción de celulosa y experimentos *in vitro* sugieren que se trata de una proteína de membrana, involucrada en la transferencia de oligómeros de celulosa de un transportador lipídico intermediario en el crecimiento de la cadena de celulosa. Los perfiles de hidrofobicidad de los productos de los genes *celD* y *celE* sugieren que CelD es una proteína soluble y CelE tiene un dominio transmembranal cercano al extremo C-terminal y datos experimentales sugieren que estas proteínas están involucradas en la síntesis de intermediarios lipídicos en la producción de celulosa^{7,10}.

Hay un modelo propuesto para la síntesis de celulosa en *A.*

tumefaciens en el cual la UDP-glucosa está unida primero a un lípido a través del producto del gen *celE* para formar un intermediario lipídico. El producto del gen *celD* también puede estar involucrado en esta reacción²⁴. El intermediario lipídico-glucosa en el citoplasma sufre de modificaciones por el producto del gen *celB*, para entonces ser incorporado por CelA (celulosa sintasa) a las cadenas de glucosa. El producto del gen *celC* tiene homología con varias endoglucanasas bacterianas, sin embargo, en el proceso de síntesis de celulosa, CelC podría estar actuando como una transferasa más que una endoglucanasa, ya que la incorporación de la glucosa a las cadenas de celulosa requieren de *celC* y mutantes en este gen son incapaces de sintetizar celulosa²⁴.

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii*

En *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, se identificaron seis genes involucrados en la síntesis de celulosa mediante una mutagénesis al azar por transposición de una cepa sobreproductora de celulosa²³. Esta cepa se identificó por la habilidad de unir el colorante rojo congo, empleado en la identificación de bacterias productoras de celulosa y fimbria agregativa^{28,13}. El análisis de micrografía de la cepa mostró una abundancia de micro-fibrillas de celulosa, que emergen radialmente de todas partes de la superficie celular, diferenciándose muy claramente de los flagelos.

El tratamiento con celulosa resultó en la total desaparición de las fibrillas²⁷. Una mutagénesis por transposición permitió la identificación de seis genes involucrados en el proceso de síntesis de celulosa en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Los genes *celABC* y *celE* son homólogos a los genes de *A. tumefaciens* y se identificaron dos genes adicionales como posibles reguladores de la síntesis de celulosa, *celR1* y *celR2*²³. Estos genes están organizados en un operón y comparten homología con productos de genes involucrados en transducción de señales en sistemas de dos componentes. CelR1 comparte homología con la proteína histidina cinasa FixL de *Rhizobia* que es un sensor de oxígeno que participa junto con el regulador transcripcional FixJ en la regulación transcripcional de genes de fijación de nitrógeno. Se ha demostrado que la proteína CelR2 tiene actividad de diguanilato ciclasa y además comparte homología con las proteínas DivK y PleD que son dos reguladores transcripcionales de *Caulobacter crescentus* y que son fosforilados por una misma histidina cinasa PleC, proteínas esenciales en la regulación de la división celular^{28,21}.

Salmonella enterica serovar Typhimurium y *Escherichia coli*

En enterobacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* también se ha detectado la producción de celulosa en morfotipos multicelulares¹³. La multicelularidad es un comportamiento común en bacterias patógenas y ambientales en ciertas etapas del desarrollo que les ofrece ciertas ventajas ecológicas. Las bacterias se benefician

de la cooperación multicelular para acceder a recursos que no pueden ser utilizados efectivamente por células individuales³⁸.

El comportamiento multicelular (morfotipo rdar) en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium está caracterizado por la formación de colonias extendidas y de superficie seca en placas de cultivos en fase estacionaria, que construyen una red celular y que se adhieren a superficies, mientras que en cultivos líquidos en fase estacionaria se observan agregados de células^{39,40}. En el morfotipo rdar, las células de *S. typhimurium* en placas de cultivo adicionadas con el colorante rojo congo se observan como colonias de color rojo debido a la absorción del colorante por la producción de celulosa y de fimbria agregativa, únicamente en fase estacionaria³⁹. El morfotipo rdar está regulado por el producto del gen *agfD*, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales FixJ³⁹. El gen *agfD* forma parte del operón *agfDEFG* y regula la transcripción del operón *agfAB* responsable de la biosíntesis de fimbria agregativa^{44,40}.

Por otro lado, AgfD regula transcripcionalmente al gen *adrA*, un gen que codifica para la proteína transmembranal AdrA que posee un dominio GGDEF y cuatro dominios transmembranales, la cual es un posible regulador de la producción de celulosa que comparte 75% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la proteína YaiC de *E. coli* (Fig. 4)¹⁰. La transcripción de *agfD* depende estrictamente de la tensión de oxígeno, obteniéndose la expresión máxima en medio rico bajo condiciones microaerofílicas y en medio mínimo bajo condiciones aeróbicas. El morfotipo rdar es expresado bajo condiciones de máxima expresión de *agfD*. Además del oxígeno, el promotor de *agfD* está regulado por condiciones ambientales, como temperatura, limitación de nutrientes, osmolaridad, cantidad de hierro disponible en la células y pH. Mutantes en el gen *agfD* pierden completamente la multicelularidad^{40,41}.

Análisis *in vivo* han demostrado que el factor sigma Rpos (σ^r), la proteína asociada a nucleóide H-NS y el factor transcripcional MlrA, influyen en la transcripción del promotor de *agfD* y la regulación en respuesta a la tensión de oxígeno, está mediada a través de un complejo de reguladores que involucra a OmpR, IHF y H-NS^{40,42,43}. Se ha demostrado que OmpR funciona como

un activador, en su forma no fosforilada se une a un solo sitio en el promotor de *agfD*, mientras que OmpR fosforilado (OmpR-P) tiene dos sitios de unión. La proteína IHF funciona como un activador del promotor de *agfD* bajo condiciones microaerofílicas pero no en condiciones aeróbicas. H-NS es un activador del promotor de *agfD* a nivel transcripcional. Los sitios de unión a OmpR, IHF y H-NS se sobrelapan, por lo que se sugiere que la unión de una proteína favorece la unión de las demás (Fig. 4)^{42,43}.

Una mutante en el gen *agfA*, que codifica para la subunidad de fimbria agregativa resulta en la formación de colonias color rosa (morfotipo pdar) que no produce fimbria y solamente produce celulosa. Una mutación en el gen *adrA* o en *rpoS* (factor sigma de la RNA polimerasa específico de fase estacionaria), da lugar únicamente a la producción de fimbria y evita la producción de celulosa, resultando colonias de color café (morfotipo bdar)⁴⁰.

Además de fimbria agregativa, el segundo componente de los morfotipos multicelulares de *S. typhimurium* y *E. coli* es la celulosa. Los genes para la biosíntesis de celulosa han sido identificados mediante análisis de homología de secuencias con los genes de *A. xylinum*, *A. tumefaciens* y *R. leguminosarum* *bv. trifolii*. Los genes *yhjL* y *yjO* son parte del cluster de genes *yhjO*, *yhjN*, *yhjM* y *yhjL* que codifican para la subunidad catalítica de la celulosa sintasa, la subunidad regulatoria de la celulosa sintasa, una endo-1,4- β -glucanasa y una oxidoreductasa respectivamente. Los genes *yhjONML* han sido renombrados *bcsABZC* y se expresan constitutivamente (Fig. 5; Tabla I). La síntesis de celulosa se lleva a cabo solamente cuando se expresa el gen *adrA*. Se ha propuesto que AdrA interactúa con una o más de las proteínas Bcs causando, ya sea, la estabilización de estas proteínas o bien, activando la producción de celulosa⁵.

Un análisis de mutantes de *Salmonella enteritidis* demostró que la celulosa es un componente requerido para la formación de biopelícula. Mutantes deficientes en la producción de celulosa no mostraron alteraciones en cuanto a la capacidad de infectar células huéspedes, sin embargo, fueron más sensibles al tratamiento con hipoclorito de sodio, por lo que, se sugiere que la producción de celulosa y la formación de biopelícula en *S.*

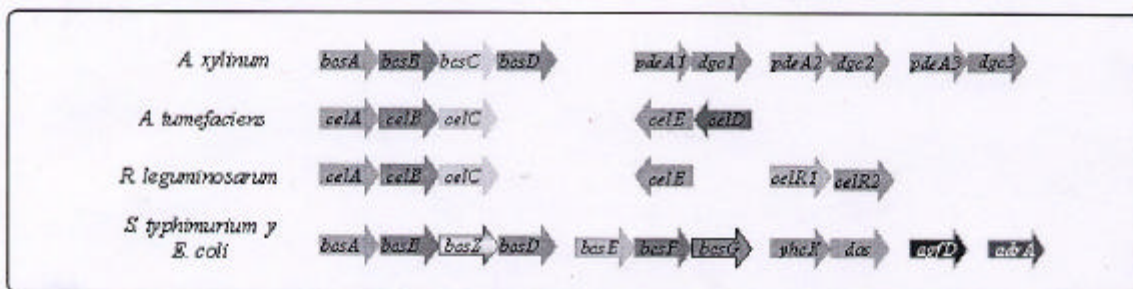


Figura 5. Genes involucrados en la síntesis de celulosa en bacterias. Para identificación de la función de los genes, véase Tabla I.

	<i>A. xylinum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
Celulosa sintasa	<i>bcsA</i>	<i>celA</i>	<i>celA</i>	<i>bcsA</i>	<i>bcsA</i>
CDGBP	<i>bcsB</i>	<i>celB</i>	<i>celB</i>	<i>bcsB</i>	<i>bcsB</i>
Endoglucanasa	<i>bcsC</i>	<i>celC</i>	<i>celC</i>	<i>bcsZ</i>	<i>bcsZ</i>
Diguanilato ciclasa	<i>dgc1, dgc2, dgc3</i>	NR*	<i>celR2</i>	<i>yciR</i>	<i>yhcK</i>
Fosfodiesterasa	<i>pdeA1, pdeA2, pdeA3,</i>	NR	NR	<i>STM3388</i>	<i>dos</i>

*NR. No reportado.

Tabla 1. Genes que participan en la producción de celulosa en bacterias.

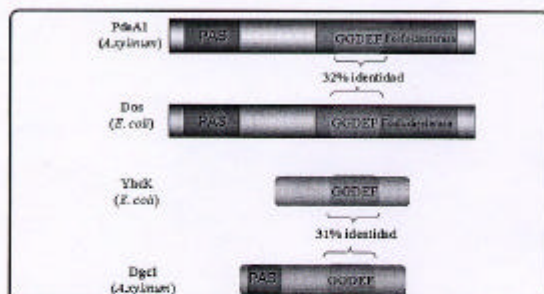


Figura 6. Homología de las proteínas Dos y YhcK de *E. coli* con sus homólogos de *A. xylinum*.

enteriditis le confieren protección a las células contra condiciones adversas del medio ambiente¹³. Además del operón *bcsABZD*, la biosíntesis de celulosa depende también del operón *yhjSTU* presente en los genomas tanto de *S. typhimurium* como de *E. coli*, renombrado como operón *bcsEFG*, en donde el gen *bcsE* codifica para una probable proteasa, el gen *bcsF* no comparte suficiente homología para asignarle una posible función y el gen *bcsG* presenta homología a nivel de nucleótidos con un gen que codifica para una endoglucanasa de *Cellulomonas uda*. Los tres genes del operón *bcsEFG* son necesarios para la síntesis de celulosa en *S. enteriditis* (Fig. 5; Tabla 1)¹³.

Recientemente se reportó que la proteína Dos de *E. coli* es un sensor de oxígeno que comparte homología a lo largo de toda la extensión de la proteína PDEA1 de *A. xylinum*²⁴. El gen *dos* está ubicado río abajo del gen *yhcK* cuyo producto tiene homología con la DGC1 de *A. xylinum* y presenta actividad de diguanilato ciclasa (Fig. 6)²⁴. Datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que los genes *dos* y *yhcK* forman un operón, el cual se transcribe únicamente en aerobiosis durante la fase estacionaria y es regulado positivamente por RpoS. Esto sugiere que posiblemente la molécula c-di-GMP esté siendo sintetizada en *E. coli* y participe en el proceso de síntesis de celulosa de manera similar a la de sus homólogos en *A. xylinum* (Méndez-Ortiz, Tesis de Doctorado en proceso).

Además de *S. typhimurium* y *E. coli*, otras enterobacterias también producen celulosa. *Citrobacter freundii* cepa Fec4

expresa el morfotipo rdar (síntesis de fimbria y celulosa) a 28°C y *Enterobacter sakazakii* cepa Fec39 expresa el morfotipo pdar (síntesis sólo de celulosa) a 28°C y 37°C⁹. En la Fig. 6 se muestra un esquema de los genes requeridos en la síntesis de celulosa bacteriana.

FUNCIÓN DE PROTEÍNAS GGDEF

La regulación por c-di-GMP no está limitada a la síntesis de celulosa. Muchas bacterias que no producen celulosa tienen proteínas con dominios homólogos a los de PDEA1 de *A. xylinum*²⁵. La mayoría de estas proteínas son de función desconocida, sin embargo, algunas de ellas participan como reguladores en procesos de transición de una fase de crecimiento a otra. Como en el caso de la proteína codificada por el gen *pleD* de *Caulobacter crescentus*, que es necesaria para la diferenciación característica de flagelada (móvil) a no flagelada o "stalked" (no móvil)⁴⁵. El desarrollo polar es una manifestación visual de la diferenciación celular en *C. crescentus*. Un polo de la célula predivisional (PD) acarrea un único flagelo y pili tipo IV, mientras que, el otro polo lleva un apéndice, de tal forma que, la división celular produce dos células especializadas, una planctónica que puede nadar o "swarmer" (SW) y otra célula no móvil capaz de adherirse a superficies para formar monocapas de células de alta densidad (Células "stalked")⁴⁵.

Estudios recientes han indicado que sistemas de transducción de señales de dos componentes están involucrados en el desarrollo polar de *C. crescentus*. Los genes *pleC*, *divJ* y *divL* codifican para sensores histidina cinasas y *divK* y *pleD* codifican para reguladores transcripcionales. Algunos estudios indican que PleC y DivJ son las histidinas cinasas que fosforilan a PleD para regular la actividad de control flagelar y pérdida de la motilidad y formación del apéndice durante la transición "swarmer" a "stalked". PleD controla negativamente la función flagelar en su conformación activa fosforilada (PleD-P) y las cinasas DivJ y PleC son responsables del control de pérdida y ganancia de motilidad en el ciclo celular de *C. crescentus* mediante la modulación de la actividad de PleD^{46,47}. Mutaciones en PleD conllevan a defectos polares pleiotrópicos que incluyen hipermotilidad y una falla para sintetizar el flagelo y elongar el apéndice en la diferenciación. PleD tiene en su extremo N-terminal dos dominios receptores (D1 y D2) agrupados en tándem y en el extremo C-terminal tiene un dominio GGDEF. Se

ha demostrado que el dominio GGDEF de un ortólogo de PleD, la proteína WspR de *Pseudomonas fluorescens*, es funcional cuando se une a los dominios D1 y D2 de la proteína PleD de *C. crescentus*. Esta proteína híbrida, pudo complementar la deficiencia del apéndice en una cepa mutante en *pleD* en *C. crescentus* sugiriendo que proteínas que poseen los dominios GGDEF están involucrados en modular las superficies de la célula y prepararlas para las interacciones célula-célula y la formación de biopelícula y no solamente son requeridos para la síntesis de exopolisacáridos, sino que, también han sido reclutados para orquestar el desarrollo planctónico de las células hacia una forma de vida basada en comunidades multicelulares complejas⁷.

Recientemente se reportó que *P. fluorescens* es una bacteria productora de celulosa y los genes involucrados en el proceso de síntesis del biopolímero están codificados en un operón que consta de 10 genes, el operón *wssA-J*, en donde WssBCDE son las subunidades de la celulosa sintasa, WssD es un homólogo de la celulosa requerida para la síntesis normal de celulosa en *A. xylinum*, WssF es de función desconocida y WssGHI muestran homología con las proteínas AlgFII de *Pseudomonas aeruginosa* requeridas para la acetilación de alginato y WssAJ muestran homología con la proteína MinD de *E. coli* involucrada en el control del ciclo celular y posicionamiento del septo de división⁸. Posiblemente WssA y WssJ estén involucrados en el posicionamiento de la celulosa sintasa en los polos de *P. fluorescens*. El complejo de celulosa sintasa *wss* en *P. fluorescens* está regulado por una vía quimio-sensora denominada Wsp, en donde el séptimo gen del cluster, *wspR*, codifica para la proteína WspR tipo CheY-GGDEF (ortólogo de PleD en *C. crescentus*) que activa la expresión de celulosa a un nivel post-transcripcional⁸.

Posteriormente se demostró que la celulosa sintetizada por *P. fluorescens* se encuentra acetilada por acción de las proteínas WssGHI y esta acetilación es crítica para la formación de biopelícula en la interfase aire-líquido. Mutantes de *P. fluorescens* que producen celulosa no acetilada, forman capas débiles de biopelícula y son deficientes en el rápido esparcimiento de las colonias. Por la implicación de la celulosa acetilada en el contacto célula-célula, el control que ejerce la proteína WspR apoya la hipótesis de que proteínas reguladoras con dominios GGDEF, juegan un papel importante en la coordinación del contacto con la superficie y las estrategias de colonización en bacterias¹².

Otro ejemplo de proteínas que poseen dominios GGDEF es la proteína MbaA de *Vibrio cholerae*⁹. La formación de biopelícula en esta bacteria ha sido descrita en varios pasos a través de análisis genéticos y microscópicos. Las bacterias primero nadan hacia una superficie usando su flagelo polar y establecen interacciones célula-superficie mediante un pili tipo IV¹⁰. Una vez hecho el contacto con la superficie, las bacterias se mueven a lo largo de la superficie mediante su flagelo, reclutando a otras células planctónicas y dividiéndose, resultando en la formación

de microcolonias. Las células adheridas sintetizan un exopolisacárido (EPS) producido por los genes *vps*, el cual se sugiere que es un componente principal de la matriz extracelular que estabiliza la biopelícula madura^{11,12}. La sobreproducción de exopolisacáridos resulta en alteraciones en la formación de biopelícula que correlaciona con un incremento en la resistencia al estrés osmótico y oxidativo, así como a biocidas tales como hipoclorito de sodio¹¹. Mutantes en *mbaA* en *V. cholerae* presentan un incremento en la producción de matriz extracelular que modifica la arquitectura de la biopelícula, la cual carece de los típicos pilares de células que son separados por canales por los que fluyen nutrientes y desechos¹¹. La composición de los componentes de esta matriz extracelular no ha sido elucidada, sin embargo, la participación de los dominios GGDEF en la regulación de la matriz extracelular apoya la sugerencia de que estos dominios ampliamente distribuidos son importantes en el establecimiento de interacciones célula-célula y célula-superficie⁹.

CONCLUSIONES

La descripción de los mecanismos moleculares necesarios en la biosíntesis de celulosa bacteriana tiene un impacto importante tanto en el aspecto médico como biotecnológico. La formación de biopelículas bacterianas así como las interacciones célula-huésped son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades nosocomiales como son las infecciones en el tracto intestinal y respiratorio en donde la celulosa tiene un papel importante. La elucidación de los mecanismos biosintéticos de celulosa permitirán la búsqueda de estrategias para combatir dichas enfermedades, así como también, la optimización de los procesos biotecnológicos para la producción masiva de celulosa por su relevancia en la industria textil entre otras.

REFERENCIAS

1. Delmer, D.P. & Amor, Y. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7, 987-1000 (1995).
2. Kawagoe, Y. & Delmer, D.P. Pathways and genes involved in cellulose biosynthesis. *Genet. Eng.* 19, 63-87 (1997).
3. Brett, C.T. Cellulose microfibrils in plants: biosynthesis, deposition, and integration into the cell wall. *Int. Rev. Cytol.* 199, 161-199 (2000).
4. Brown, R., Willison, J.H. & Richardson, C.L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 73, 4565-4569 (1976).
5. Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & Romling, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452-1463 (2001).
6. Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. & Romling, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 71, 4151-4158 (2003).
7. Matthyssse, A.G., White, S. & Lightfoot, R. Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 177, 1069-1075 (1995).

8. Zevenhuizen, L.P., Bertocchi, C. & van Neerven, A.R. Congo red absorption and cellulose synthesis by *Rhizobiaceae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **52**, 381-386 (1986).
9. Legge, R.L. Microbial cellulose as a speciality chemical. *Biotechnol. Adv.* **8**, 303-319 (1990).
10. Romling, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* **153**, 205-212 (2002).
11. Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35-58 (1991).
12. Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. & Rainey, P.B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* **50**, 15-27 (2003).
13. Solano, C. *et al.* Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* **43**, 793-808 (2002).
14. Romling, U. *et al.* Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 273-285 (2003).
15. Amano, A., Nakagawa, I. & Hamada, S. Studying initial phase of biofilm formation: molecular interaction of host proteins and bacterial surface components. *Methods Enzymol.* **310**, 501-513 (1999).
16. Cannon, R.E. & Anderson, S.M. Biogenesis of bacterial cellulose. *Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 435-447 (1991).
17. Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H. & Benizman, M. Intermediary steps in *Acetobacter xylinum* cellulose synthesis: studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. *J. Bacteriol.* **143**, 1142-1150 (1980).
18. Ross, P. *et al.* Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281 (1987).
19. Kimura, S., Chen, H.P., Saxena, I.M., Brown, R. & Itoh, T. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **183**, 5668-5674 (2001).
20. Wong, H.C. *et al.* Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8130-8134 (1990).
21. Mayer, R. *et al.* Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5472-5476 (1991).
22. Saxena, I.M. & Brown, R.M.Jr. Identification of a second cellulose synthase gene (*acxII*) in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **177**, 5276-5283 (1995).
23. Ross, P. *et al.* The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothiolate derivatives. *J. Biol. Chem.* **265**, 18933-18943 (1990).
24. Weinhouse, H. *et al.* c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett.* **416**, 207-211 (1997).
25. Tal, R. *et al.* Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* **180**, 4416-4425 (1998).
26. Iyer, L.M., Anantharaman, V. & Aravind, L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics*, Publicación en línea <http://biomedcentral.com/1471-2164/4/5> (2003).
27. Pei, J. & Grishin, N.V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* **42**, 210-216 (2001).
28. Ausmees, N. *et al.* Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 163-167 (2001).
29. Amikam, D. & Benziman, M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **171**, 6649-6655 (1989).
30. Chao, Y., Sugano, Y. & Shoda, M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 673-679 (2001).
31. Gilles-González, M.A. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* **51**, 165-173 (2001).
32. Chang, A. *et al.* Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* **40**, 3420-3426 (2001).
33. Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. & Lindberg, M. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* **145**, 1253-1262 (1999).
34. Matthyse, A.G., Thomas, D.L. & White, A.R. Mechanism of cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **177**, 1076-1081 (1995).
35. Matthyse, A.G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* **154**, 906-915 (1983).
36. Matthyse, A.G., Holmes, K.V. & Gurlitz, R.H. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* **145**, 583-955 (1981).
37. Cao, Y. & Tan, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydr. Res.* **337**, 1291-1296 (2002).
38. Shapiro, J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 81-104 (1998).
39. Romling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K. & Normark, S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28**, 249-264 (1998).
40. Romling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. & Reinkoster, J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36**, 10-23 (2000).
41. Gerstel, U. & Romling, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Microbiol.* **3**, 638-648 (2001).
42. Gerstel, U., Park, C. & Romling, U. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* **49**, 639-654 (2003).
43. Gerstel, U. & Romling, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res. Microbiol.* **154**, 659-667 (2003).
44. Delgado-Nixon, V.M., González, G. & Gilles-González, M.A. Dos, a heme-binding PAS protein from *Escherichia coli*, is a direct oxygen sensor. *Biochemistry* **39**, 2685-2691 (2000).
45. Smit, J., Sherwood, C.S. & Turner, R.F. Characterization of high density monolayers of the biofilm bacterium *Caulobacter crescentus*: evaluating prospects for developing immobilized cell bioreactors. *Can. J. Microbiol.* **46**, 339-349 (2000).
46. Wu, J., Ohta, N. & Newton, A. An essential, multicomponent signal

- transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 13068-13073 (1998).
47. Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. & Jenal, U. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **47**, 1695-1708 (2003).
48. Spiers, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Trivisano, M. & Rainey, P.B. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics* **161**, 33-46 (2002).
49. Bomchil, N., Watnick, P. & Kolter, R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J. Bacteriol.* **185**, 1384-1390 (2003).
50. Watnick, P.I., Fullner, K.J. & Kolter, R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **181**, 3606-3609 (1999).
51. Yildiz, F.H. & Schoolnik, G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 4028-4033 (1999).
52. Yildiz, F.H., Dolganov, N.A. & Schoolnik, G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* **183**, 1716-1726 (2001).

ANEXO 4

Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano

Micaela Marcela Méndez-Ortiz,* Jorge Membrillo-Hernández*

RESUMEN. La disponibilidad de las secuencias de múltiples genomas de bacterias ha permitido estudiar la presencia de dominios proteicos comunes para muchas especies bacterianas. Recientemente se han descrito los dominios GGDEF y EAL, los cuales presumiblemente tienen la función de diguanilato ciclasa (c-di-GMP sintasa) y fosfodiesterasa de c-di-GMP respectivamente. El c-di-GMP se ha involucrado en la producción de celulosa bacteriana así como en la modificación de la superficie celular que le permite regular la formación de biopelículas, la motilidad y la virulencia entre otros procesos bacterianos.

Palabras clave: Dominio GGDEF, dominio EAL, c-di-GMP, diguanilato ciclasa, fosfodiesterasa.

ABSTRACT. The availability of multiple bacterial genome sequences has led to the discovery of several conserved domains of proteins. Recently, GGDEF and EAL domains have been described as domains responsible for the synthesis and degradation of c-di-GMP, a second messenger in bacteria. c-di-GMP has been involved in cellulose production and identified as a global regulator of several processes such as biofilm formation, motility and virulence, presumably through a modification of the cell surface properties.

Key words: GGDEF domain, EAL domain, c-di-GMP, diguanilate cyclase, phosphodiesterase.

INTRODUCCIÓN

Entender cómo los organismos reconocen los distintos ambientes que los rodean así como los mecanismos que utilizan para adaptarse a sus nichos ha sido de amplio interés en la biología.

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de transducción de señales para responder a los cambios ambientales, por ejemplo, los sistemas de dos componentes, ampliamente distribuidos en estos organismos, que consisten de una proteína histidina cinasa, por lo regular anclada a la membrana, la cual posee un residuo de histidina que al detectar una señal ambiental específica se fosforila en forma dependiente de ATP y puede transferir el grupo fosfato a un segundo componente, llamado regulador de respuesta, que frecuentemente es un factor transcripcional encargado de la regulación de genes involucrados en esa respuesta.¹⁸

Existe otra forma de transducción de señales en las bacterias y es el caso de los segundos mensajeros. El más estudiado en *Escherichia coli* y en otras bacterias es la molécula monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) la cual es una molécula de bajo peso molecular que entre muchas funciones, se une al factor transcripcional CRP en la represión catabólica.⁴⁵

Otro segundo mensajero en bacterias es la molécula tetrafosfato de guanidina (ppGpp), que se produce en respuesta a la limitación de nutrientes y en circunstancias que detienen el crecimiento bacteriano. El ppGpp se une directamente a las unidades β y β' de la RNA polimerasa y afecta un gran número de funciones fisiológicas, principalmente la transcripción de genes relacionados con el crecimiento, con la respuesta a estrés y con la respuesta a la falta de nutrientes.²⁷

En las bacterias se encuentra al menos otro segundo mensajero: el bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP). La función del c-di-GMP se ha estudiado poco; recientemente se ha reportado que lo sintetizan proteínas con actividad de diguanilato ciclasa a partir de dos moléculas de GTP y que poseen en su estructura el dominio conservado llamado GGDEF. El c-di-GMP lo hidrolizan fosfodiesterasas que poseen el dominio EAL.

Las proteínas con dominios GGDEF y EAL se distribuyen ampliamente en las bacterias y los análisis *in silico* han mostrado que las proteínas que los poseen se asocian a muchos dominios que funcionan como sensores. Sin embargo, su papel fisiológico aún se desconoce y ha despertado un creciente interés entre los microbiólogos por descubrirlo. La presente revisión intenta recopilar los trabajos más recientes en los que se ha relacionado a las proteínas con dominios GGDEF y EAL, involucrados en el recambio celular de c-di-GMP.

EL SEGUNDO MENSAJERO C-DI-GMP

El bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) es un dinucleótido cíclico que consiste de dos residuos de riboguanosina unidos por enlaces 2'-5' fosfodiés-

* Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

ter que forman una estructura cíclica (Fig. 1). La estructura cristalina de dicha molécula muestra una columna rígida formada por dímeros intercalados y el análisis de espectroscopia de masas sugirió un arreglo de cuatro moléculas de c-di-GMP alineados para formar dos cuartetos de guanina paralelos con una cavidad central.^{10,20} El carácter ácido del c-di-GMP le permite formar sales con iones presentes en el medio como Li^+ , Na^+ y K^+ y algunos análisis de espectroscopia de UV, de dicroísmo circular y de resonancia magnética nuclear mostraron que el c-di-GMP en solución puede adoptar distintas formas estructurales (polimorfismos) dependiendo del ion al que se asocie. Sin embargo, la estructura de cuartetos de guanina en presencia de iones K^+ es la que más se favorece.⁵² La demanda de c-di-GMP para el estudio de sus funciones fisiológicas ha conducido al desarrollo de métodos para su síntesis química.^{23,35,52}

El c-di-GMP se identificó inicialmente como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa (CS) en la bacteria productora de celulosa *Acetobacter xylinum*, ya que incrementa la actividad de la síntesis de este polímero de manera específica.³⁷ La enzima encargada de sintetizar c-di-GMP es la proteína diguanilato ciclasa (DGC) y la proteína que lo degrada tiene actividad de fosfodiesterasa (PDEA).³⁸ Recientemente se ha reportado que el c-di-GMP está implicado en otros procesos celulares bacterianos como formación de las biopelículas, la motilidad y la virulencia, entre otros.⁸

DESCRIPCIÓN DE LOS DOMINIOS GGDEF Y EAL

Los dominios GGDEF y EAL se han descrito recientemente y se distribuyen ampliamente en procariones.⁴⁷

El dominio GGDEF consta de aproximadamente 170 residuos de aminoácidos y recibe este nombre debido al patrón de secuencia conservado GG[DE][DE]F. Este dominio se caracte-

rizó por primera vez en la proteína PleD de *Caulobacter crescentus*, un regulador de respuesta que se requiere para la transición de células motiles flageladas a células no motiles las cuales tienen una estructura llamada prosteca, que es una elongación de la célula que le permite adherirse a superficies.¹

En una búsqueda de proteínas homólogas a las que tienen el dominio GGDEF se encontró que este dominio está relacionado estructuralmente con la familia de las adenilato ciclasas. La comparación por métodos bioinformáticos de estas proteínas muestra la conservación de dominios y de residuos catalíticos importantes así como de patrones de hidrofobicidad similares, lo cual sugiere que ambas familias se relacionan evolutivamente y que probablemente los mecanismos de catálisis son similares.³¹

Los dominios GGDEF han llamado la atención por estar altamente conservados y reiterados en los genomas bacterianos, aunque las bacterias Gram positivas tienden a tener menos proteínas con este dominio que las Gram negativas, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* tiene sólo una proteína con el dominio GGDEF, *Bacillus subtilis* tiene 4 proteínas con este dominio, ambas Gram positivas. En contraste, *Synechocystis* sp tiene 22, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tiene 33, *Escherichia coli* K-12 tiene 19, *Vibrio cholerae* O1 biotipo EITor tiene 41 y *Aquifex aeolicus*, 12 proteínas con el dominio GGDEF, todas ellas Gram negativas (Tabla 1).^{13,31}

El dominio EAL que se denomina así por sus residuos conservados (glutamato-alanina-leucina) consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y se describió originalmente en la proteína BvgR de *Bordetella pertussis*, un factor transcripcional que regula los genes de virulencia (*vrg*) en esta bacteria.^{13,28}

Por otro lado, el dominio EAL se descubrió independientemente como un dominio adyacente al dominio GGDEF posible responsable de la actividad de fosfodiesterasa de c-di-

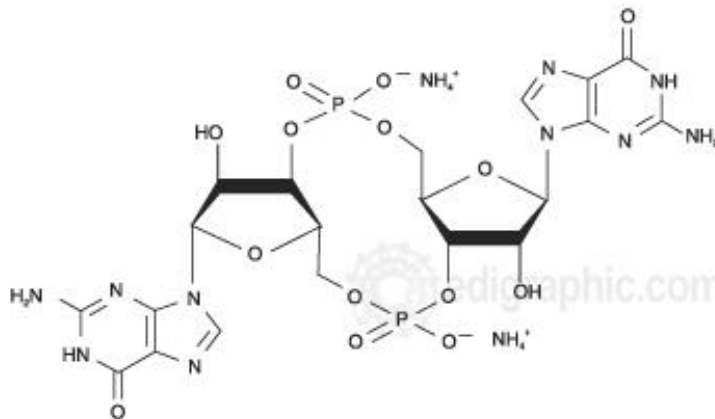


Figura 1. Estructura química del c-di-GMP. G, guanosina.

GMP en la proteína PDEA1 de *A. xylinum*.⁴⁶ Este dominio contiene residuos de aminoácidos de carácter ácido que podrían participar en la unión a metales y potencialmente podrían formar un sitio activo de fosfodiesterasa. Al igual que el dominio GGDEF, el dominio EAL también se encuentra en varias proteínas de un mismo genoma bacteriano (Tabla 1).¹³

LOS DOMINIOS PROTEICOS GGDEF Y EAL SE ENCUENTRAN ASOCIADOS A DOMINIOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La disponibilidad de secuencias completas de genomas bacterianos ha permitido descubrir que ambos dominios GGDEF y EAL se encuentran asociados a muchos dominios receptores que participan en redes de transducción de señales (Fig. 2).

Entre los dominios asociados a GGDEF y a EAL se encuentran los dominios PAS y GAF.¹¹ Los dominios PAS se distribuyen ampliamente en las bacterias, las arqueas y los eucariotes y están frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales. Estos dominios comparten un plegamiento típico de cadenas $\alpha\beta$, comparten menos del 15% de identidad de secuencias y están acoplados a actividades enzimáticas o a dominios de unión a DNA. Entre las señales que detectan los dominios PAS se encuentra el oxígeno, la luz, el voltaje, el potencial redox y los hidrocarburos aromáticos.^{15,50}

Los dominios GAF también son dominios de señalización que se encuentran en el citoplasma, tienen una estructura similar a los dominios PAS, y se caracterizan por tener

una estructura de bolsillo que pueden albergar pequeñas moléculas como ligantes.¹¹ Los dominios GAF se describieron originalmente como dominios conservados de unión a GMPc en fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.¹³

Por otro lado, en algunas bacterias, los dominios GGDEF y los EAL se asocian con los dominios CACHE (por la denominación en inglés *calcium and chemotaxis*) propios de los canales de Ca^{2+} y de los receptores de quimiotaxis, además, también se encuentran en homólogos a las tres principales clases de proteínas sensoras, las histidinas cinasas de clase I, las metil aceptoras (MCP's) y las adenilato ciclasas.^{50,53}

Los dominios GGDEF y EAL también se asocian al dominio CHASE (llamado así por la denominación en inglés *cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular domain*), módulo extracelular presente en varias proteínas sensoras, y aunque es menos común que el dominio CACHE, también se puede encontrar en histidinas cinasas, adenilato ciclasas y posibles diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas aunque no en sistemas de quimiotaxis.^{50,53}

El dominio MHYT (descrito en inglés como *Met-His-containing YkoW transmembrane domain*) es un dominio transmembranal que se encuentra en los sensores del tipo histidina cinasa presentes en los genomas de *Bacillus subtilis*, de *Caulobacter crescentus*, de *Mesorhizobium loti* y de *Pseudomonas aeruginosa*. Este dominio consiste de seis segmentos transmembranales interconectados por regiones citoplásmicas y regiones periplásmicas cortas ricas en arginina. En estas bacterias el dominio MHYT se encuentra en muchas proteínas como dominio único o bien fusionado a otros dominios de señalización tales como el PAS, el GGDEF, el EAL, el CheY y el HTH. La función de este dominio no se conoce pero podría formar centros de cobre útiles en la detección del O_2 , del NO y del CO.¹²

Los dominios NIT (por la designación en inglés *nitrate- and nitrite-sensing*), MASE1 y MASE2 (por la designación en inglés *membrane-associated sensor*) se descubrieron por medio del análisis de las secuencias de los genomas bacterianos. La función de éstos se desconoce pero se propone que podrían participar en la detección del nitrato y del nitrito para el caso de NIT o bien para la detección de hierro y oxígeno en el caso de MASE1 y MASE2. Estos dominios se encuentran ligados a dominios de señalización y también a los dominios GGDEF y EAL, al igual que el dominio HAMP característico de las proteínas histidina cinasas, adenilato ciclasas y MCP's.^{29,40}

Finalmente, el dominio HNOB (por la designación en inglés *heme-nitric oxide binding*) se asocia al dominio GGDEF. Este dominio se encontró originalmente en las proteínas guanilato ciclasa solubles de eucariotes pero también en algunas proteínas de bacterias que participan como sensores en la quimiotaxis.²⁰

Tabla 1. Número de copias de los dominios GGDEF y EAL presentes en algunas bacterias.

Bacteria	GGDEF	EAL
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	8
<i>Bacillus halodurans</i>	4	2
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	0
<i>Caulobacter crescentus</i>	11	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	16	5
<i>Escherichia coli</i>	19	17
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0
<i>Mesorhizobium loti</i>	32	18
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	21
<i>Synechocystis sp</i>	23	13
<i>Thermotoga maritima</i>	11	0
<i>Vibrio cholerae</i>	41	22
<i>Xylella fastidiosa</i>	3	3

Datos tomados de Galperin MY et al.¹³

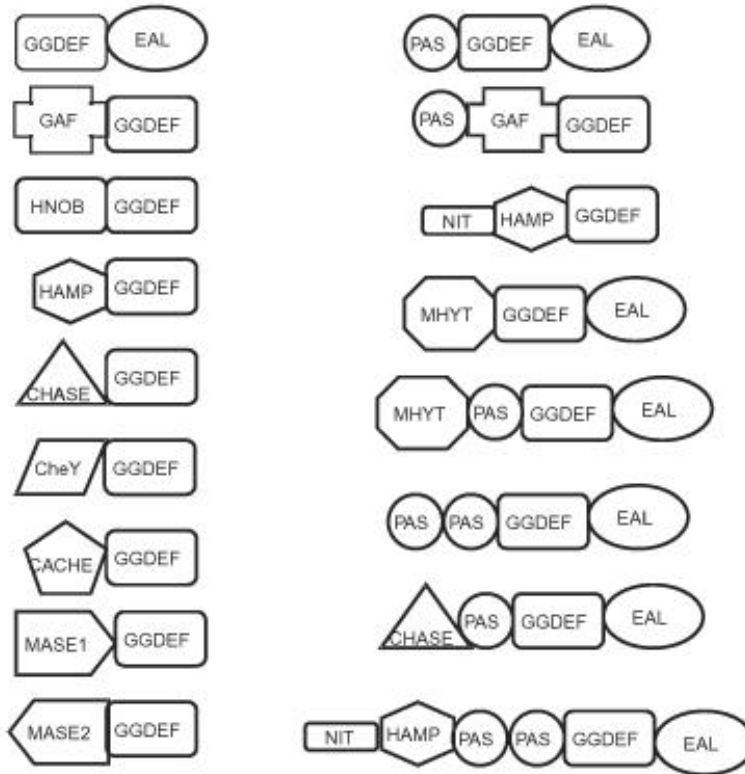


Figura 2. Asociación de los dominios GGDEF y EAL con otros dominios de señalización celular.

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS GGDEF Y EAL EN EL METABOLISMO DE BACTERIAS

Acetobacter xylinum

La función de la mayoría de las proteínas que poseen los dominios GGDEF y EAL aún se desconoce, sin embargo, en la bacteria productora de celulosa *A. xylinum* se comprobó experimentalmente que las proteínas DGC y PDEA, que tienen estos dominios, son enzimas que sintetizan y degradan el c-di-GMP respectivamente.⁴⁶

La síntesis de celulosa en *A. xylinum* está a cargo de la enzima celulosa sintasa la cual tiene dos subunidades, una subunidad catalítica que se encarga de sintetizar el polímero de celulosa a partir de UDP-glucosa, y una subunidad de unión a c-di-GMP, también llamada proteína de unión a c-di-GMP (CDGBP). Ambas subunidades están ancladas en la membrana citoplasmática y se asocian a otras dos protei-

nas (AcsA y AcsD) que se localizan en la membrana externa y que se requieren para el ensamblaje y la excreción del polímero de glucosa.²⁴

En *A. xylinum* la concentración celular de c-di-GMP se estima que es de 5 a 10 μM ; aproximadamente, la misma concentración del AMPc pero 100 veces más baja que la de GMPc. Sin embargo, muy poco del c-di-GMP se encuentra libre en la célula, pues alrededor del 80% de este compuesto se encuentra unido a la proteína CDGBP para evitar así su degradación enzimática llevada a cabo por la proteína PDEA1.^{30,51}

En *A. xylinum*, la concentración intracelular de c-di-GMP se determina por la acción opuesta de tres enzimas diguanilato ciclasa (DGC1, DGC2, DGC3) y tres enzimas fosfodiesterasa de diguanilato (PDEA1, PDEA2, PDEA3), las cuales se codifican en tres operones independientes. Cada una de las tres proteínas DGC (codificadas por los genes *dgc1*, *dgc2*, *dgc3*) y las tres proteínas PDEA (codificadas por los genes *pdeA1*, *pdeA2* y *pdeA3*), muestran un arreglo de dominios

PAS-GGDEF-EAL y un arreglo genético *pdeA-dgc* que sugiere una regulación tipo operón. El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas revela un alto grado de identidad estructural en cada grupo de isoenzimas. Las seis proteínas contienen los dominios GGDEF y EAL en las regiones de carboxilo terminal (C-terminal) y los dominios sensores en el amino terminal (N-terminal). Algunos estudios realizados en mutantes en los tres operones muestran que hay una jerarquía funcional en donde el operón *cdg1* es la fuente del 80% de la actividad enzimática de DGC y PDEA y los operones *cdg2* y *cdg3* contribuyen con el 15 y el 5% de la actividad, respectivamente.^{36-38,46} Aunque se ha demostrado que las proteínas DGC y PDEA tienen actividades opuestas, sus dominios son prácticamente idénticos por lo que el sitio catalítico tanto para la síntesis como para el rompimiento del c-di-GMP permanece sin determinarse.

Para probar la hipótesis de que los dominios GGDEF en diferentes proteínas tienen actividad de diguanilato ciclasa, se realizaron experimentos de complementación genética empleando tres genes distintos que codifican para proteínas cuyo único elemento en común es el dominio GGDEF. Los genes empleados fueron *celR2* (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*), *dgc1* (*Acetobacter xylinum*) y *yhcK* (*Escherichia coli*) los cuales fueron clonados en vectores de expresión y utilizados para transformar una cepa mutante *celR2* (que codifica para una c-di-GMP sintasa) de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* deficiente en la producción de celulosa. En los tres casos, la transformación resultó en la recuperación de la capacidad de producir celulosa. Estos datos genéticos sugirieron que las proteínas que contienen el dominio GGDEF, poseen actividad de diguanilato ciclasa y que este dominio es el responsable de dicha actividad.^{3,39}

Caulobacter crescentus

Caulobacter crescentus es la bacteria en la cual se ha estudiado con mayor detalle el papel del dominio GGDEF. En esta bacteria se ha descrito un mecanismo de diferenciación celular en el cual participa la proteína PleD que contiene un dominio GGDEF. Esta proteína la codifica el gen *pleD* y se requiere para la diferenciación característica de células flageladas (móviles) a células no flageladas (no móviles).^{2,21}

El desarrollo polar es una manifestación visual de la diferenciación celular en *C. crescentus*. Un polo de la célula pre-divisional acarrean un único flagelo o pili tipo IV, mientras que el otro polo lleva un apéndice, de tal forma que, la división celular produce dos células especializadas, una célula planetónica móvil y otra célula no-móvil capaz de adherirse a superficies para formar monocapas de células.¹

Algunos estudios recientes indican que los sistemas de transducción de señales de dos componentes están involucrados en el desarrollo polar de *C. crescentus*. Los genes *pleC*,

divJ y *divI*, codifican para sensores histidina cinasas y los genes *divK* y *pleD* codifican para reguladores transcripcionales. Hay evidencias que indican que PleC y DivJ son las histidinas cinasas que fosforilan a PleD para regular la actividad de control flagelar y la pérdida de la motilidad y formación del apéndice durante la transición de célula móvil a célula no móvil. PleD controla negativamente la función flagelar en su conformación activa fosforilada (PleD-P) y las cinasas DivJ y PleC son las responsables del control de la pérdida y de la ganancia de motilidad en el ciclo celular de *C. crescentus* mediante la modulación de la actividad de PleD.³ Ciertas mutaciones en PleD producen defectos polares pleiotrópicos que incluyen hiper-motilidad y una falla para sintetizar el flagelo y elongar la prostecca en la diferenciación. PleD tiene en su extremo N-terminal dos dominios receptores (D1 y D2) contiguos y en el C-terminal tiene un dominio GGDEF. Se ha demostrado que una proteína híbrida que contiene el dominio GGDEF de un ortólogo de PleD, la proteína WspR de *Pseudomonas fluorescens*, y los dominios D1 y D2 de la proteína PleD de *C. crescentus* es funcional ya que es capaz de complementar la deficiencia del apéndice en una cepa mutante en *pleD*. Esto sugiere que las proteínas que poseen dominios GGDEF no solamente se requieren para la síntesis de exopolisacáridos sino que participan en modular las superficies de la célula y favorecen las interacciones célula-célula que conllevarán a la formación de biopelículas, es decir a una forma de vida basada en comunidades multicelulares complejas.²

Un análisis de la localización de PleD mostró que ésta se distribuye en toda la célula móvil pero durante la diferenciación celular, su forma activa (fosforilada) se concentra en el polo de la prostecca en la célula no-móvil.³⁰ Una proteína PleD constitutivamente activa produce células con la prostecca elongada y con un efecto negativo dominante en la motilidad.²

El hecho de que el dominio GGDEF de *P. fluorescens* pudiera complementar la actividad de PleD de *C. crescentus* sugirió que esta proteína podría tener una actividad de diguanilato ciclasa intrínseca y así sintetizar c-di-GMP el cual podría actuar como un posible segundo mensajero. Un ensayo con la proteína PleD purificada mostró que tiene actividad de diguanilato ciclasa y esta actividad es independiente del estado de fosforilación de la proteína, aunque en su forma activa (fosforilada) tiene mayor actividad de ciclasa. En contraste, la actividad de diguanilato ciclasa de la proteína Rrp1 de *Borrelia burgdorferi* requiere de la fosforilación de la proteína.³⁹ Por otro lado la proteína PleD no mostró actividad de fosfodiesterasa.³⁰

El análisis cristalográfico de la proteína PleD permitió proponer un posible mecanismo de catálisis en el cual la reacción de condensación de dos moléculas de GTP para formar c-di-GMP requiere que la proteína forme dímeros. El análisis enzimático mostró que existe una inhibición alostérica por producto, esto es, la actividad de PleD se in-

hibe cuando se rebasa un límite máximo en la concentración c-di-GMP. Esto sugiere que debe haber una regulación muy fina en la actividad de las proteínas que sintetizan y degradan este dinucleótido.⁵

Salmonella enterica serovar *Typhimurium*

La agregación celular es un comportamiento común en las bacterias patógenas y en los aislados ambientales en ciertas etapas del desarrollo, lo que les ofrece ventajas ecológicas. Las bacterias se benefician de la cooperación multicelular para acceder a los recursos que no pueden utilizar efectivamente como células individuales. En *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* el comportamiento multicelular ocurre como consecuencia de cambios en la composición de la matriz extracelular. Estos cambios se producen al sintetizar fimbria agregativa, celulosa o ambas sustancias y dan lugar a tres morfotipos: El morfotipo **rdar** aparece cuando *Salmonella* produce fimbria agregativa y celulosa, se caracteriza por colonias de apariencia rugosa y de color rojo en placas de medio suplementado con el colorante rojo congo. El morfotipo **bdar** se produce cuando se sintetiza únicamente fimbria agregativa y da lugar a colonias lisas de color café en placas con rojo congo. Finalmente, el morfotipo **pdar** que da origen a colonias lisas y de color rosa en placas con rojo congo, es característico de células que únicamente producen celulosa.⁵⁴

AdrA es una proteína de 371 aminoácidos con un extremo amino que contiene cuatro regiones transmembranales y un dominio GGDEF de 180 aminoácidos en el extremo carboxilo.⁵⁴ Una inserción en el gen que la codifica provocó el cambio del morfotipo **rdar** al morfotipo **bdar**, es decir, al morfotipo en el cual sólo se sintetiza fimbria agregativa y no celulosa.⁵⁴ Esta observación sugirió de que la proteína AdrA podría participar en la regulación de la producción de celulosa en *S. typhimurium*.⁵⁴

En *S. typhimurium* la celulosa es un componente importante para la formación de biopelículas.^{44,54} Un análisis de complementación de una cepa de *S. typhimurium* que no forma biopelículas con un banco genético de una cepa productora de biopelículas llevó a la identificación de un grupo de siete genes capaces de restaurar la formación de biopelículas. Todos ellos codifican proteínas que comparten el dominio GGDEF. Estas proteínas se nombraron Gcp (por la designación en inglés *GGDEF domain containing protein*). Por otro lado, una mutante Δ adrA se transformó sistemáticamente con cada uno de los genes *gcp* expresados en un plásmido y el resultado fue que no todas las proteínas Gcp restauraron la producción de celulosa en esta mutante. Dos proteínas, GcpA y MlrA fueron las que corrigieron en mayor grado la deficiencia en la síntesis de celulosa. El único elemento en común entre estas proteínas es el domi-

nio GGDEF al igual que con el resto de las proteínas Gcp. Una de estas proteínas, GcpE, no pudo complementar a la mutante en *adrA* y su sobreproducción eliminó la producción de celulosa en una cepa silvestre; por el contrario, una mutación en el gen *gcpE* incrementó la producción de celulosa. La proteína GcpE además del dominio GGDEF contiene un dominio EAL por lo que se sugiere que esta proteína podría actuar como una fosfodiesterasa que cataliza la degradación de c-di-GMP a 5'GMP como la proteína PDEA1 de *A. xylinum*. Por lo anterior y dado que existen varias proteínas con los dominios GGDEF y EAL en los genomas bacterianos, se sugiere que existe un orden jerárquico en la utilización de proteínas GGDEF para la transducción de señales.¹⁴

Por otro lado, las proteínas AdrA y YhjH de *S. typhimurium*, se usaron como un sistema modelo para estudiar la relación funcional entre los dominios GGDEF y los dominios EAL con el metabolismo del c-di-GMP. Las células que sobre-expresan AdrA, elevan su producción de celulosa y en ellas se puede detectar, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MALDI-TOF), la presencia de c-di-GMP. Los niveles de expresión de AdrA correlacionaron con el incremento de c-di-GMP. Además, las cepas que acarrean mutaciones que modifican el dominio GGDEF (G288A y G289A) de AdrA no produjeron niveles de c-di-GMP detectables.⁴² La proteína YhjH contiene únicamente un dominio EAL. La sobreproducción de esta proteína disminuyó la síntesis de celulosa y la concentración de c-di-GMP producidas por AdrA. Una mutante YhjH afectada en el residuo de glutamato conservado del dominio EAL (E136A) no disminuyó la producción de celulosa ni alteró los niveles de c-di-GMP generados por AdrA. La sobre-expresión de la fosfodiesterasa YhjH en *S. typhimurium* provoca que se incrementen la motilidad y el nado en agar suave, mientras que la diguanilato ciclasa AdrA los disminuyen. Estos resultados sugieren fuertemente que los dominios GGDEF y EAL están directamente involucrados en la síntesis y en la degradación del c-di-GMP (Fig. 3).⁴²

Por otro lado, en una búsqueda de los genes implicados en la virulencia de *S. typhimurium* mediante mutagénesis por inserción de transposón se encontró al gen *cdgR* (por *c-di-GMP regulator*), que codifica para una proteína capaz de disminuir los niveles celulares de c-di-GMP y que tiene únicamente un dominio EAL.¹⁷ La proteína CdgR confiere resistencia al estrés oxidativo pues mutantes del gen *cdgR* son más susceptibles a la acción bactericida del H₂O₂ que la cepa silvestre respectiva o que una cepa complementada con el gen *cdgR* silvestre. La proteína CdgR también participa en la virulencia de *S. typhimurium* al incrementar su capacidad para matar macrófagos.¹⁷

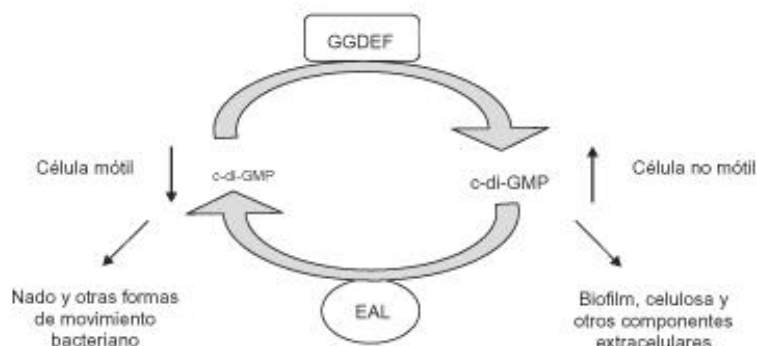


Figura 3. Comportamiento bacteriano a niveles bajos y altos de c-di-GMP. El recambio de c-di-GMP está mediado por los dominios GGDEF y EAL. Modificado de Sim, et al.⁴²

Vibrio cholerae

Vibrio cholerae es una bacteria patógena que puede cambiar reversiblemente de un estado virulento a uno no virulento. En el fenotipo virulento la bacteria está embebida en una red de polisacáridos extracelulares que le confieren a la colonia una apariencia rugosa y que favorece la formación de la biopelícula. En el fenotipo no virulento se abate la síntesis de exopolisacáridos por lo que las colonias muestran una apariencia lisa.³³

En una búsqueda de los determinantes que intervienen en el cambio reversible de células rugosas a lisas y viceversa, se encontró a la proteína RocS que es una proteína que tiene los dominios GGDEF y EAL. Las mutantes afectadas en el gen *rocS* no son capaces de cambiar al fenotipo rugoso y presentan deficiencias en la motilidad por lo que se sugiere que RocS tiene un papel importante en la regulación de los determinantes de virulencia de esta bacteria. El análisis de la secuencia de la proteína RocS mostró que tiene mayor similitud con la enzima diguanilato ciclasa (DGC1) que con la fosfodiesterasa (PDEA1) de *A. xylosum* ya que estas proteínas DGC1 y PDEA1 tienen también los dominios GGDEF y EAL.^{33,46} La proteína RocS podría regular la producción de exopolisacáridos, la formación de las biopelículas y la virulencia a través del segundo mensajero c-di-GMP.³³

Por otro lado, la virulencia de *V. cholerae* está regulada por otros factores además de la proteína RocS. Entre estos factores se encuentran el sistema de tres componentes VieSAB codificadas en el operón *vieSAB* en donde VieS es una histidina cinasa mientras que VieA y VieB son dos reguladores de respuesta que participan en la regulación transcripcional del operón *ctxAB* que codifica para las subunidades A y B de la toxina de cólera (CT). Probablemente es una regulación indirecta pues los niveles de *toxT*, el gene de uno de los reguladores

transcripcionales del operón *ctxAB*, disminuyen en una cepa Δ *vieSAB*.⁴⁵

VieA es una proteína que porta un dominio EAL, pero que además tiene las características propias de los reguladores de respuesta típicos de los sistemas de dos componentes: un residuo de aspartato fosforilable y un dominio de unión a DNA (*helix-turn-helix*, HTH).¹³

Esta proteína también regula indirectamente la producción de los exopolisacáridos en *V. cholerae*. Los operones *vpsA-D* y *vpsL-Q* codifican para la síntesis de los exopolisacáridos cuya activación transcripcional depende del factor VpsR. Por su parte, la proteína VieA disminuye los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la actividad de fosfodiesterasa que le confiere el dominio EAL. Esta disminución provoca que los niveles de transcrito del gen *vpsR* bajen y por tanto disminuya también la transcripción de los genes *vps* y la síntesis de exopolisacáridos que se requieren para la formación de biopelículas.⁴⁸

El cambio en concentración de c-di-GMP es una consecuencia de la disminución en la actividad de fosfodiesterasa del dominio EAL de VieA o del aumento de la actividad de ciclasa de una o más proteínas GGDEF. Se propone que los genes *vps* responden al incremento en la concentración de c-di-GMP a través de algún factor de transcripción que percibe este compuesto y regula la expresión del gen *vpsR*.⁴⁸

Por otro lado, la proteína MbaA (por la designación en inglés *maintenance of biofilm architecture*) es otra de las múltiples proteínas que presentan los dominios GGDEF y EAL en *V. cholerae*. Esta proteína participa en la maduración y el mantenimiento de la arquitectura de la biopelícula en esta bacteria. La mutación Δ *mbaA* no afecta las etapas tempranas de la formación de la biopelícula pero provoca una acumulación del material extracelular que resulta en una formación de una biopelícula de arquitectura distinta a la típica de pilares de células separados por canales. Aunque no se ha demos-

trado, los dominios presentes en la proteína MbaA sugieren que esta proteína podría regular las concentraciones del segundo mensajero c-di-GMP, posiblemente requerido para el mantenimiento de la matriz extracelular en las biopelículas de *V. Cholerae*.⁵

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que habita en una amplia variedad de ambientes entre los que se incluye el suelo, el agua, los tejidos de plantas y los tejidos de mamíferos, entre otros. En los humanos, *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista que se establece en forma de biopelícula y afecta a individuos inmunocomprometidos o que sufren de fibrosis quística.⁴¹

Del esputo de pacientes con fibrosis quística se pueden aislar variantes de *P. aeruginosa* que presentan resistencia al tratamiento con antibióticos y que comparadas con células no resistentes presentan una morfología distinta. Las células resistentes a los antibióticos forman colonias pequeñas y de apariencia rugosa (RSCV por la designación en inglés *cough small-colony variant*). En contraste, las células sensibles forman colonias lisas de mayor tamaño. Las células RSCV forman agregados de células en medio de cultivo líquido, y biopelículas con mayor contenido de biomasa y de arquitectura distinta a las que pueden formar las células sensibles.⁹

P. aeruginosa es capaz de cambiar del fenotipo RSCV al fenotipo silvestre de manera transitoria, lo que le permite a la bacteria modificar su resistencia a antibióticos. Estos cambios están regulados por la proteína PvrR, un regulador de respuesta del tipo de los sistemas de dos componentes, homólogo a la proteína VieA de *V. cholerae* en todos sus dominios incluyendo el dominio EAL.⁹ La presencia del dominio EAL sugiere que la disminución de los niveles de c-di-GMP podría ser un factor determinante en estos procesos y potencialmente un arma importante para el tratamiento de infecciones por esta bacteria.^{8,16}

Por otro lado, la autoagregación de *P. aeruginosa* provoca la formación de colonias rugosas y está relacionada con la adhesión de las células en el proceso de formación de biopelículas. Esta agregación la regula la proteína WspR, un factor transcripcional del tipo regulador de respuesta de sistemas de dos componentes que tiene un dominio GGDEF.⁷ La función opuesta sugerida para los dominios GGDEF y EAL es consistente con la actividad mostrada por la proteína WspR (GGDEF) para inducir la autoagregación y la actividad de la proteína PvrR (EAL) para reprimirla.⁸

P. aeruginosa tiene 33 proteínas con el dominio GGDEF y 21 proteínas con el dominio EAL.¹⁵ sin embargo se conoce la función de sólo algunas de estas proteínas. Por ejemplo, la proteína FimX tiene ambos dominios y se localiza en un polo de la célula. A esta proteína se le ha relacio-

nado con la regulación del movimiento tipo "twitching", que es un movimiento provocado por la extensión y retracción del pili requerido para la formación de biopelículas.¹⁹

Otras bacterias

Con la publicación constante de genomas bacterianos secuenciados en su totalidad se han identificado cada vez más proteínas con dominios GGDEF y EAL. De la mayoría de ellas se desconoce su función pero se les ha ido involucrando en diferentes procesos bacterianos. Por ejemplo, el caso de las proteínas HmsT y HmsP de *Yersinia pestis*. Esta bacteria tiene la capacidad de formar colonias teñidas de color café verdoso o rojo al unir hemina o rojo congo (RC) respectivamente (fenotipo Hms⁺), a temperaturas menores a 34°C. A mayor temperatura las colonias son siempre de color blanco.³²

Dentro de los genes involucrados en la regulación del fenotipo Hms⁺ se encuentran las proteínas HmsP y HmsT. La primera de estas proteínas, HmsP codifica para una fosfodiesterasa de c-di-GMP pues contiene un dominio EAL que le confiere dicha actividad.⁴ Mutantes en *hmsP* forman colonias rojas en medio suplementado con RC a 26°C y a 37°C y la complementación con el gen *hmsP* provoca la formación de colonias blancas a ambas temperaturas. Por otro lado, la proteína HmsT codifica para una diguanilato ciclasa, puesto que tiene un dominio GGDEF en su estructura capaz de sintetizar c-di-GMP.⁴¹ La formación de biopelícula en *Y. pestis* depende de los genes *hms*. Esta bacteria forma biopelícula a 26°C pero no a 37°C. Cuando se sobreexpresa el gen *hmsT* o hay una mutación en el gen *hmsP*, la formación de biopelícula se incrementa considerablemente por lo que se sugiere que su formación depende de la concentración de c-di-GMP.²⁵

Un caso muy interesante es el de la bacteria patógena Gram positiva *Staphylococcus aureus* que a diferencia de la mayoría de las especies bacterianas, tiene únicamente una proteína con el dominio conservado GGDEF y otra proteína con un dominio GGDEF modificado. Se ha demostrado que la adición de c-di-GMP a una concentración de 200µM, a *S. aureus*, trastorna sus interacciones célula-célula puesto que disminuye su capacidad de agregación, de formación de cúmulos de células y de formación de biopelículas.²²

Se ha sugerido que el c-di-GMP podría formar complejos y secuestrar las moléculas que se requieren para la formación de las biopelículas o que el c-di-GMP podría unirse a receptores de membrana bloqueando señales externas, o bien, podría unirse a factores de transcripción que modifiquen la expresión de genes requeridos para la formación de biopelículas. Este hallazgo es relevante en el aspecto clínico pues el c-di-GMP ofrece una alternativa en el control de infecciones debidas a esta bacteria patógena ya que si se usa como agente terapéutico pudiera inhibir la formación de biopelículas y, por tanto, su establecimiento en células humanas y animales.²²

La síntesis y la degradación de c-di-GMP por proteínas que tienen los dominios GGDEF y/o EAL se ha demostrado en muchas otras bacterias, por ejemplo en: *Thermotoga*, *Deinococcus*, cianobacterias, espiroquetas y otras α y γ -proteobacterias; sin embargo el papel fisiológico en el que participa el c-di-GMP en ellas no se conoce.³⁹

CONCLUSIONES

Los análisis *in silico* de las secuencias reportadas de los genomas bacterianos han permitido la identificación de nuevos dominios proteicos que permiten asignar posibles papeles a proteínas de función desconocida. El descubrimiento de que los dominios GGDEF y EAL participan en el recambio de las concentraciones celulares de c-di-GMP, una molécula que repercute en varios procesos bacterianos tales como la síntesis de celulosa, la formación de biopelículas, la diferenciación celular y virulencia, abre una nueva frontera en el estudio de la transducción de señales de bacterias pues el c-di-GMP puede transducir numerosas señales en respuesta a diversos estímulos, tal como lo hace el GMPc en vertebrados.

Sin embargo, el estudio de esta nueva vía de transducción de señales se encuentra en sus etapas más tempranas pues quedan muchas preguntas por resolver para poder establecer los mecanismos en los cuales el c-di-GMP actúa como segundo mensajero.

Dada la reiteración de los dominios GGDEF y EAL en una misma especie bacteriana surge el interés por entender esta aparente redundancia de funciones. Probablemente existe algún tipo de jerarquía y diferencia en las actividades enzimáticas que provocan la utilización de una u otra proteína.

Por otro lado, establecer a qué proteínas o sustratos se une el c-di-GMP ayudará a elucidar los mecanismos por los cuales actúa. Los candidatos más viables para la acción del c-di-GMP como segundo mensajero son proteínas de membrana, reguladores transcripcionales, histidinas cinasas y canales iónicos, entre otros. Finalmente, el uso de herramientas moleculares globales como los análisis del transcriptoma y del proteoma para analizar la transcripción de los genes y la síntesis de proteínas reguladas por la concentración de c-di-GMP dará pistas importantes para abordar estos cuestionamientos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por los proyectos IN205200 y IN207703 de PAPIIT INAM; J33369 y 42580 de CONACYT México. M.M.M.-O. es becaria de CONACYT y DGEP-UNAM. A la Dra. G. Soberón y al S. Encarnación por los comentarios al manuscrito.

REFERENCIAS

- Aldridge, P. and U. Jenal. 1999. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* 32:379-391.
- Aldridge, P., R. Paul, P. Gojmer, P. Rainey, and U. Jenal. 2003. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 47:1695-1708.
- Ausances, N., R. Mayer, H. Weinhouse, G. Volman, D. Amikam, M. Benziman, and M. Lindberg. 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 204:163-167.
- Bobrov, A., O. Kirillina, and R. Peny. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 247:123-130.
- Bomchlal, N., P. Warnick, and R. Kolter. 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol* 185:1384-1390.
- Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. Amiot, B. Giese, U. Jenal, and T. Schirmer. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17084-17089.
- D'Argenio, D., M. Calfee, P. Rainey, and E. Pesci. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184:6481-6489.
- D'Argenio, D. and S. Miller. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150:2497-2502.
- Drenkard, E. and F. Ausubel. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416:740-743.
- Egli, M., R. Gessner, I. Williams, G. Quigley, G. van der Marel, J. van Boom, A. Rich, and C. Frederick. 1990. Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3235-3239.
- Galperin, M. 2005. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* 6:552-567.
- Galperin, M., T. Gastenko, A. Mulikidjanian, M. Nakano, and C. Price. 2001. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett* 205:17-23.
- Galperin, M., N. Nikolskaya, and E. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203:11-21.
- García, B., C. Latasa, C. Solano, F. García-del Portillo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 54:264-277.
- Gilles-Gonzalez, MA. 2001. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* 51:165-173.
- Haussler, S. 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 6:546-551.
- Hiset, K., M. Maccoss, M. Shiloh, K. Darwin, S. Singh, R. Jones, S. Eht, Z. Zhang, B. Gaffney, S. Gandoira, D. Holden, D. Murray, and C. Nathan. 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defense and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* 56:1234-1245.
- Hoch, J. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3:165-170.
- Huang, B., C. Whitechurch, and J. Mattick. 2003. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:7068-7076.
- Iyer, L., V. Arantharaman, and L. Aravind. 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* 4:Publicación en línea.

21. Jacobs, C., D. Hung, and L. Shapiro. 2001. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4095-4100.
22. Karaolis, D., M. Rashid, R. Chyllanya, W. Luo, M. Hyodo, and Y. Hayakawa. 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1029-1038.
23. Kawai, R., R. Nagata, A. Hirata, and Y. Hayakawa. 2003. A new synthetic approach to cyclic bis(3'→5')diguanylic acid. *Nucleic Acids Res Suppl* 3:103-104.
24. Kimura, S., H. Chen, I. Saxena, R. Brown Jr, and T. Itoh. 2001. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 183:5668-5674.
25. Kirillina, O., J. Fetherston, A. Bobrov, J. Abney, and R. Perry. 2004. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 54:75-88.
26. Liaw, Y., Y. Gao, H. Robinson, G. Sheldrick, L. Shiedregt, G. van der Mare, J. van Boom, and A. Wang. 1990. Cyclic diguanylic acid behaves as a host molecule for planar intercalators. *FEBS Lett* 264:223-227.
27. Magnusson, L., A. Farewell, and T. Nyström. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13:236-242.
28. Merkel, T., C. Barros, and S. Stibitz. 1998. Characterization of the *bugR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 180:1682-1690.
29. Nikolskaya, A., A. Mukhijanian, I. Baech, and M. Galperin. 2003. MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5:11-16.
30. Paul, R., S. Weiser, N. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18:715-727.
31. Pei, J. and N. Grishin. 2001. GGDEF domain is homologous to adenyllyl cyclase. *Proteins* 42:210-216.
32. Perry, R., A. Bobrov, O. Kirillina, H. Jones, L. Pedersen, J. Abney, and J. Fetherston. 2005. Temperature regulation of the hemin storage (Hms⁺) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J Bacteriol* 186:1638-1647.
33. Rashid, M., C. Rajana, A. Ali, and D. Karaolis. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* 227:113-119.
34. Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark, and J. Reinkoster. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* 36:10-23.
35. Ross, P., Y. Aloni, H. Weinhouse, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, and M. Benziman. 1986. Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, a unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydr Res* 49:101-117.
36. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55:35-58.
37. Ross, P., R. Mayer, H. Weinhouse, D. Amikam, Y. Huggir, and M. Benziman. 1990. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J Biol Chem* 265:18933-18943.
38. Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Mare, J. van Boom, and M. Benziman. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325:279-281.
39. Ryjenkov, D., M. Tarutina, O. Moskvina, and M. Gomselsky. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* 187:1792-1798.
40. Shu, C., L. Ulrich, and I. Zhulin. 2003. The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci* 28:121-124.
41. Simm, R., J. Fetherston, A. Kader, U. Romling, and R. Perry. 2005. Phenotypic Convergence Mediated by GGDEF-Domain-Containing Proteins. *J Bacteriol* 187:6816-6823.
42. Simm, R., M. Moer, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53:1123-1134.
43. Singh, P., A. Schaefer, M. Parsek, T. Moninger, M. Welsh, and E. Greenberg. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407:762-764.
44. Solano, C., B. Garcia, J. Valle, C. Berasain, J. Ghigo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43:793-808.
45. Stulke, J. and W. Hillen. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2:195-201.
46. Tal, R., H. Wong, R. Callicoon, D. Gelfand, A. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana, and M. Benziman. 1998. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180:4416-4425.
47. Tatusov, R., D. Natale, I. Garkavtsev, T. Tatusova, U. Shankavaram, B. Rao, B. Kiryutin, M. Galperin, N. Fedorova, and E. Koonin. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29:22-28.
48. Tischler, A. and A. Camilli. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 53:857-869.
49. Tischler, A., S. Lee, and A. Camilli. 2002. The *Vibrio cholerae* *vieSAB* locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J Bacteriol* 184:4104-4113.
50. Ulrich, L., E. Koonin, and I. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13:52-56.
51. Weinhouse, H., S. Sapir, D. Amikam, Y. Shilo, G. Volman, P. Ohana, and M. Benziman. 1997. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett* 416:207-211.
52. Zhang, Z., B. Gaffney, and R. Jones. 2004. c-di-GMP displays a monovalent metal ion-dependent polymorphism. *J Am Chem Soc* 126:16700-16701.
53. Zhulin, I., A. Nikolskaya, and M. Galperin. 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol* 185:285-294.
54. Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Romling. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452-1463.

Correspondencia:

Jorge Membrillo-Hernández

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular,
Departamento de Biología Molecular y
Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-228, Ciudad Universitaria, 04510,
México, D.F. Tel.- (55) 56 22 38 40
Fax.- (55) 56 22 38 55
E-mail: jmh@biomedicas.unam.mx

ANEXO 5



Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12

Maritrini Colón-González, M. Marcela Méndez-Ortiz, Jorge Membrillo-Hernández*

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 70-228, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico

Received 12 February 2004; accepted 15 March 2004

Available online 12 April 2004

Abstract

Association with a surface in a structure known as biofilm is the prevailing microbial lifestyle. Here we show the kinetics of biofilm formation of *Escherichia coli* W3110 in static cultures growing under aerobic or anaerobic conditions. Aerobically growing cells in LB medium started to produce detectable amounts of biofilm after 4 to 8 h, displaying maximal accumulation of formed biofilm at 24 h, corresponding to the onset of stationary phase. Then an abrupt reduction in the biomass of the biofilm was observed. This decrease was not prevented by external addition of fresh nutrients and coincided with the depletion of oxygen as measured by the enzymatic activity of the AdhE protein. No biofilm formation was detected in cultures grown anaerobically in LB or LB supplemented with nitrate, nitrite, DMSO or fumarate, even after 72 h of incubation, well inside the stationary phase, suggesting that under anaerobic growth conditions *E. coli* cannot form biofilms.

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Biofilm; *Escherichia*; Oxygen; Extracellular signaling; Anaerobic growth

1. Introduction

Bacterial lifestyle in natural environments occurs normally as a complex group of bacteria attached to a surface in a structure called biofilm rather than living in a free-swimming, planktonic state [9]. It is known that biofilm-associated bacteria differ from their free-living counterparts; for example, biofilm-associated bacteria generally possess increased resistance to antimicrobial agents [18,19]. Recent genetic and genomic studies have shown that biofilm is formed in multiple steps [42] and in some organisms requires intercellular signaling [2,36], and that a specific genetic profile of gene transcription is needed for biofilm formation [3,14,35,44].

Escherichia coli has been a useful model for the study of genetic determinants of biofilm formation [17,28,30]. Mutant cells lacking flagella (*flhC*, *flhC* or *flhD*) or affected in motility (*motB*) are severely impaired in their first steps

of biofilm formation [30]. Recently, CsrA and RpoS were identified as key regulators of biofilm formation [1,7,20]. In addition, the formation of biofilms is strongly influenced by the nutritional environment [28,30].

Initial experiments performed by Christensen et al. [6] and O'Toole and Kolter [26,27] led to the establishment of a standard technique for the visualization and quantification of bacterial biofilm formation [28] where cells are first grown for 24–48 h without shaking in PVC microtiter dishes. Then the wells are rinsed with water and subsequently stained with 1% crystal violet for 20 min. This staining procedure allows the visualization of cells that are attached to the PVC surface as such cells are stained purple with crystal violet, whereas abiotic surfaces are not stained purple. This technique has proven to be useful for the isolation of mutants affected in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, and *E. coli* [12,26,27].

Previous observations [10,11,26,30] showed that in most cases, the highest amounts of formed biofilm are found at the air–liquid interface. A probable role of oxygen was suggested; however no experimental data was provided. In this communication, we report on the kinetics of biofilm for-

* Corresponding author.
E-mail address: jmh@biomedicas.unam.mx
(J. Membrillo-Hernández).

mation of static cultures grown under aerobic or anaerobic growth conditions. Our results strongly suggest that under anaerobic growth conditions *E. coli* cannot form biofilms.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

E. coli W3110 [F^- *lam-In* (*rrnD-rrnE*)1 *rph-I*] was used throughout this study. Other strains used were MC1061 [*araD139* Δ (*araABC-leu*)7697 Δ (*lac*)X74 *galU galK hsdR rpsL150 thi*], MG1655 (F^- *lam^- rph^-*) and MC4100 (F^- *araD139* Δ *lacU169* *rpsL150* *relA1* *flb-5301* *deoC1* *ptsF25*).

For overnight (ON) cultures, an isolated colony was inoculated in 3 ml of LB [Luria–Bertani medium [25]] supplemented with 100 mM 3-(*N*-morpholino) propane sulfonate (MOPS) and 0.2% glucose (LB-MOPS) and grown at 37 °C [8,25,34]. Starting pH of the media before inoculation was 7.0 and after 72 h of growth it was 7.4. Polyvinyl chloride (PVC) microtiter wells containing 150 μ l of LB-MOPS were inoculated with cells from an ON culture (starting $OD_{600\text{ nm}} = 0.1$). When spent media were used for bacterial growth, two sequential centrifugation steps at 14000 *g* and a 0.45 μ m filtration step were performed before re-inoculation with bacterial cells. Growth curves were determined by measuring the $OD_{600\text{ nm}}$. For anaerobic growth conditions, Gas-Pak system (BBL Sparks, MD) CO_2 jars were used following the manufacturer's instructions. To make Congo red plates, Congo red (J.T. Baker) 40 μ g/ml and Coomassie blue (Sigma) 20 μ g/ml were added to a salt-less LB agar media.

2.2. Biofilm assays

Biofilm assays were carried out at 37 °C using 96-well, non-tissue culture-treated PVC dishes (Costar, Cambridge, MA) as previously reported [7,28]. Every experiment was performed in triplicate at least three times to confirm the results. To prevent evaporation, microtiter dishes were covered with a plastic box. Visualization of attached cells was performed by removing the cell culture, staining the wells with 1.0% crystal violet for 20 min, and rinsing the wells three times with distilled water. Similar results were obtained when non-distilled water or fresh LB medium was used for rinsing. Importantly, crystal violet did not stain the plastic of the microtiter dishes even after 60 min of incubation (data not shown). Quantification was carried out spectrophotometrically at $OD_{590\text{ nm}}$ eluting the attached crystal violet with a solution of 80% ethanol and 20% acetone [17]. Standard deviation (SD) was carried out for at least three independent experiments. For aerobic kinetic biofilm formation studies we inoculated several wells of one plate and at the indicated times, only those designated wells were removed and stained with crystal violet; the other wells were left in the 37 °C oven. For anaerobic

biofilm determinations, microtiter dishes were divided into several inoculated wells and placed in different anaerobic jars (as many as needed for a whole experiment). At the indicated times, wells were removed and stained with crystal violet. Growth motility assays were performed on tryptone (1.3%)-NaCl (0.7%)-glucose (0.2%)-agar (0.3%) plates as previously described [40].

2.3. Ethanol oxidoreductase assays

Cells were disrupted by sonication in an ice bath, and the centrifuged extracts were assayed for enzyme activity at 25 °C as previously described [24]. The assay mixture (1 ml) consisted of 1.6 M ethanol, 0.3 M potassium carbonate buffer (pH 10.0), and 0.66 mM NAD. The formation of NADH upon enzyme addition was monitored spectrophotometrically at 340 nm. Protein determination was carried out by the Bradford protocol as described earlier [23].

2.4. β -Galactosidase assays

β -Galactosidase activity specified by the chromosomal Φ (*adhE-lacZ*) transcriptional fusion of strain ECL4000 [24] was measured as described by Miller [25]. Briefly, samples of cultures harvested at different times of the growth curve were suspended in 1 ml of Z buffer [25] and stored on ice. β -Galactosidase activity in $CHCl_3$ and sodium dodecyl sulfate-permeabilized cells was measured by monitoring the hydrolysis of *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside. Activities are expressed in terms of the $OD_{600\text{ nm}}$ of cell suspensions by the formula of Miller [25]. Each culture was assayed in triplicate; results were confirmed in at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Influence of anaerobic conditions on biofilm formation

Previous studies on bacterial biofilm formation have focused on the determination of aerobic biofilm formation after 24 or 48 h [28]. In order to study the kinetics of biofilm formation, we cultured the *E. coli* K-12 W3110 strain under aerobic or anaerobic growth conditions on LB-MOPS media in PVC microtiter dishes. The formation of biofilm was monitored at different times of incubation. As shown in Fig. 1, biofilm formation was evident after 8 h of incubation as a purple ring (after crystal violet staining) at the air-liquid interface in aerobic static cultures (Fig. 1C). By contrast, no biofilm formation was observed in anaerobic cultures at the same times of incubation or even after 72 h (Fig. 1D). It is important to note that under both growth conditions, strain W3110 reached stationary phase after 15 h (aerobically) and 25 h (anaerobically) (Figs. 1A and 1B). To determine whether our observations were true for other *E. coli* strains, we tested strains MC4100, MG1655, and

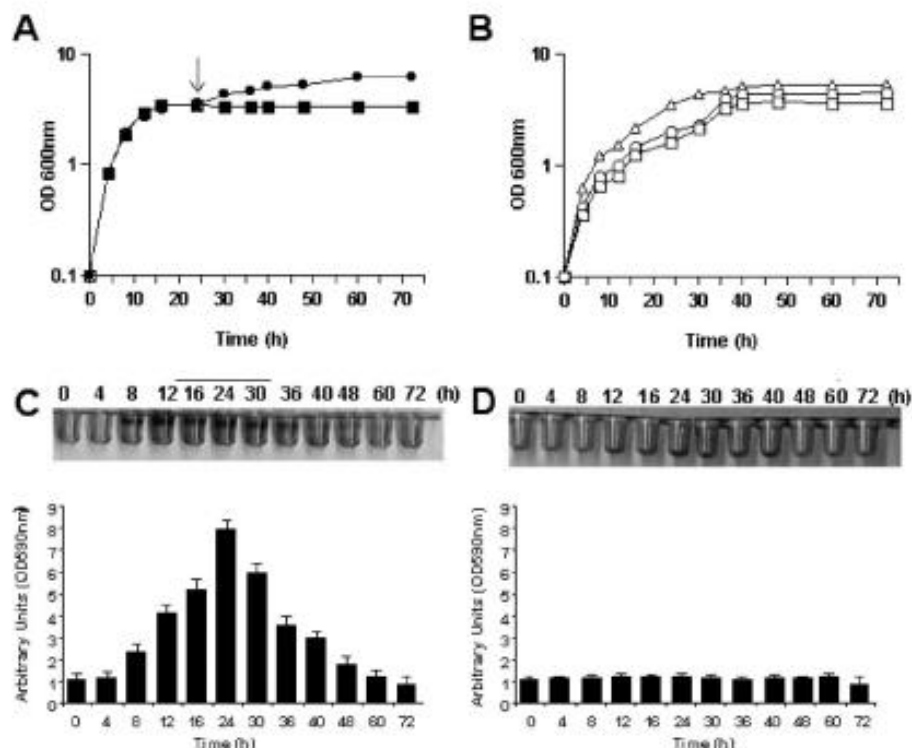


Fig. 1. Growth curves and biofilm formation of static cultures of *E. coli* W3110 at different times of incubation under aerobic or anaerobic conditions. *E. coli* cells were cultured at 37 °C in LB-MOPS media aerobically (A and C) or anaerobically (B and D) on PVC microtiter dishes. Crystal violet biofilm detection assay was performed at the indicated times (C and D). Quantification of biofilm formed under aerobic (C) or anaerobic (D) conditions is shown. Standard deviation (SD) is shown in the graph ($n = 3$). One arbitrary unit corresponds to the $OD_{690\text{nm}}$ at the start of the curve (time = 0). The growth curves of aerobically (A) or anaerobically (B) growing planktonic cultures are shown. (A) Filled squares: W3110 in LB-MOPS medium. Filled circles: LB-MOPS medium but supplemented with 0.2% glucose at 24 h (arrow). (B) Empty squares: LB-MOPS medium. Empty circles: LB-MOPS medium supplemented with nitrate (40 mM). Empty triangles: LB-MOPS medium supplemented with glucose 0.2%.

MC1061 (see Section 2). In all cases, biofilm formation was not observed under anaerobic growth conditions (data not shown). These results strongly suggest that under our experimental conditions, the presence of oxygen is required for biofilm formation in *E. coli*.

3.2. Influence of oxygen on *E. coli* detachment

As shown in Fig. 1C, maximal amounts of biofilm formation were observed at around 24 h of aerobic incubation, and then a marked decrease in the amounts of biomass of formed biofilm was evident. This phenomenon is difficult to explain in terms of deficient attachment properties or a decrease in the growth rate because the biofilm observed after crystal violet staining is normally the result of a cumulative process. Our results would mean that biofilm detaches from the wells after a certain period of incubation. One possibility is that cells are detaching from the wells in response to starvation conditions. To test this hypothesis we added 0.2% glucose to aerobic cultures grown for 24 h; however, the ki-

netics of biofilm displayed in Fig. 1C was not altered despite the fact that the growth was reinitiated (Fig. 1A, filled circles). Previous studies have shown that aerobic cultures reach anaerobiosis after 24 h of incubation even in shaking flasks [41]. Thus, anoxia is probably a detachment signal of biofilm formed by *E. coli*. To test this hypothesis, we incubated strain W3110 on LB-MOPS medium on two microtiter plates under aerobic conditions for 12 h. At that time bacterial cells were forming biofilm (Fig. 1C) but had not reached the maximum biomass attainable under aerobic conditions (Fig. 1A). We then transferred one plate to anaerobic conditions for 4, 8, 12 or 24 h (Fig. 2A). After 4 h of anaerobic incubation, the amount of attached biofilm decreased dramatically, by 40%, as judged by the abrupt decline in crystal violet staining (Fig. 2A). A 90% decrease in biomass of formed biofilm was observed after 24 h of anaerobic incubation (Fig. 2A). The control plate of the experiment (incubated under aerobic conditions) followed the same biofilm formation kinetics as in Fig. 1C (data not shown). On the other hand, anaerobically growing W3110 cells were transferred

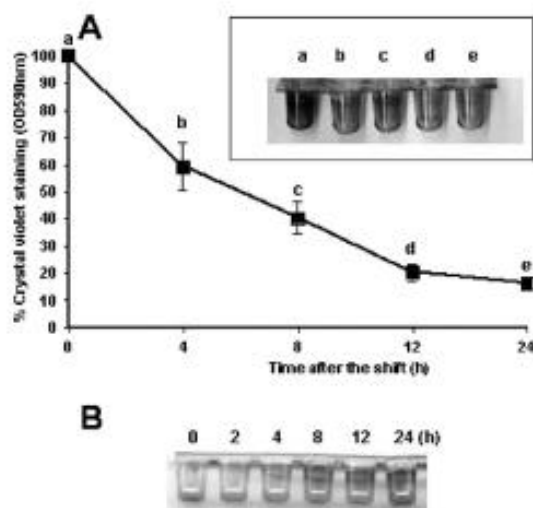


Fig. 2. Biofilm formation after a shift from aerobic to anaerobic (A) or from anaerobic to aerobic (B) culture conditions. (A) A 12 h LB-MOPS aerobic culture was shifted to anaerobic conditions and biofilm formation was monitored before (a) and after 4 (b), 8 (c), 12 (d), and 24 h (e) of anaerobic growth. Inset: crystal violet stained wells of a typical experiment. Graph indicates the percentage of remaining crystal violet attached to the wells. 100% corresponds to the $OD_{590\text{nm}}$ of a 12 h aerobically grown culture. Bars indicate SD ($n = 3$). (B) Crystal violet stained wells of a typical experiment of a shift from anaerobic to aerobic culture conditions.

to aerobic conditions and biofilm formation was monitored. Invariably, biofilm formation was observed after 4–8 h following the shift to aerobiosis regardless of the growth phase of the culture (Fig. 2B). Taken together, these results indicate that lack of oxygen may be a detachment signal for *E. coli*-formed biofilms.

To further explore whether, under our experimental conditions (cultures statically growing on microtiter dishes), anaerobiosis is reached at around 24 h of aerobic incubation, we determined the AdhE (NAD⁺ ethanol oxidoreductase) enzymatic activity of strain W3110 at different times during the aerobic growth cycle. AdhE is an Fe²⁺-containing oxidoreductase that is subjected to metal-catalyzed oxidation (MCO) inactivation [23,24], so that AdhE is inactivated upon exposure to oxygen. Thus, AdhE activity is a useful monitor of the oxygen presence in the cultures. As shown in Fig. 3, AdhE activity was heavily induced only after 18–24 h of incubation, suggesting that under our experimental conditions, anoxia is probably reached at around this period of time. Moreover, we took advantage of strain ECL4000 [23] that bears a chromosomal $\Phi(adhE-lacZ)$ transcriptional fusion. Expression of the *adhE* gene is induced upon oxygen depletion [23]. A culture of strain ECL4000 grown on microtiter plates displayed an abrupt (8- to 10-fold) increase in β -galactosidase activity specified by a $\Phi(adhE-lacZ)$ after 18–24 h of incubation under static culture conditions (data not shown).

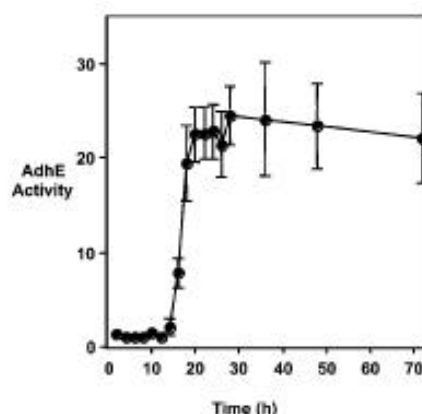


Fig. 3. AdhE specific activity of strain W3110 during aerobic planktonic culture conditions. Cultures were grown in LB-MOPS and incubated at 37 °C. Samples were removed at the indicated times and the AdhE activity was determined. Bars indicate SD ($n = 3$). Activity is reported as nanomoles of NADH produced per minute per milligram of protein.

Taken together, these results suggest that anaerobiosis is reached after 18–24 h of growth under static culture conditions.

3.3. Biofilm formation under anaerobic growth conditions in the presence of different electron acceptors

In the absence of oxygen, *E. coli* can use different electron acceptors such as nitrate, nitrite, DMSO (dimethylsulfoxide plus molybdate) or fumarate [41]. In order to test whether the electron transport chain is involved in the biofilm formation of *E. coli*, we incubated W3110 cells aerobically or anaerobically in the presence of nitrate (40 mM), nitrite (5 mM), DMSO (40 mM + 0.1 mM molybdate) or fumarate (40 mM). In all cases, aerobic biofilm-formation was similar to that of LB-MOPS-only cultures (Fig. 4, top panel). In the same way, anaerobic cultures supplemented with any of the different electron acceptors did not form biofilm under anoxic conditions (Fig. 4, bottom panel). These results indicate that regardless of the final electron acceptor, *E. coli* is unable to form biofilm under anaerobic growth conditions.

3.4. Influence of extracellular signals on biofilm formation

It is now widely accepted that cell–cell signaling in some microorganisms is an important element in biofilm formation [2,36]. Recently, it was reported that *E. coli* produces extracellular signals that may participate in quorum sensing and biofilm formation [7,37,38]. We reasoned that the lack of biofilm formation under anaerobic growth conditions could be due to a failure in producing these molecular signals. To test this hypothesis we mixed similar amounts of anaerobically-grown planktonic cells pellets (48 h; Fig. 5, inset b) with spent media from a 12 h aerobic culture (already

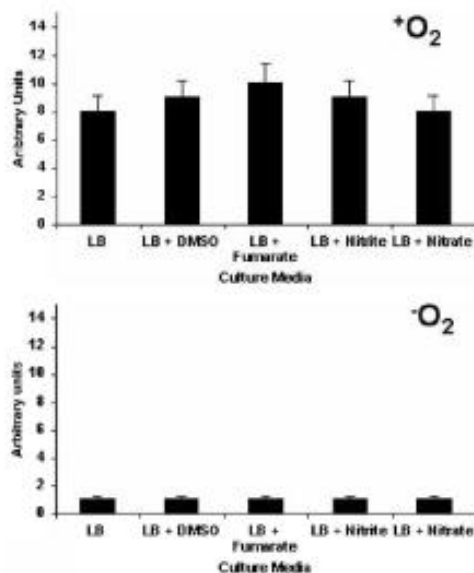


Fig. 4. Effect of the presence of different electron acceptors on the biofilm formation in cultures of strain W3110 grown aerobically or anaerobically. Crystal violet assay was performed in wells of static cultures of 24 (aerobic; top panel) and 48 h (anaerobic; bottom panel). Cells were grown in the presence of nitrate (40 mM), nitrite (5 mM), DMSO (40 mM + 0.1 mM molybdate) or fumarate (40 mM). One arbitrary unit corresponds to the amount of crystal violet eluted from the culture grown anaerobically on LB. Bars indicate SD ($n = 6$).

in biofilm formation state; Fig. 5, inset a) and incubated the mixture anaerobically for a further 48 h. If there was a molecular signal in the aerobic supernatant, this would promote biofilm formation under anaerobic conditions. As shown in Fig. 5 no biofilm formation was observed under these conditions. Similar results were obtained when similar amounts of cell pellets from anaerobic cultures were incubated with anaerobic supernatants or fresh LB-MOPS medium and incubated anaerobically (Fig. 5). These results suggest that no promoting molecular signals for biofilm formation were present in supernatants from aerobically growing cultures that could induce biofilm formation under anaerobic conditions.

On the other hand, it may be possible that an extracellular signal produced under anaerobic conditions prevents the formation of biofilm under these conditions. To test this possibility, we mixed similar amounts of aerobically grown cells (24 h) with anaerobic spent medium from 48 h cultures and the mixture was incubated aerobically. If there was an inhibitory signal in the anaerobic supernatant, a decrease in aerobic biofilm formation would be observed. As shown in Fig. 5, biofilm formation was not affected by the presence of anaerobic supernatants. These results indicate that no inhibitory signal is present in the anaerobic spent media that prevents biofilm formation under aerobic growth conditions.

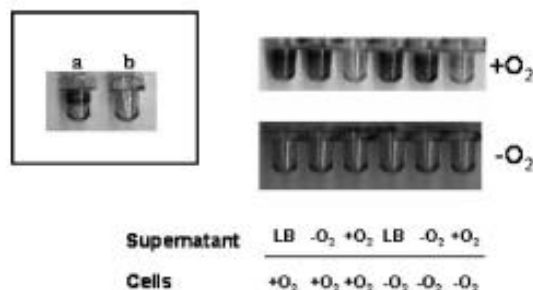


Fig. 5. Effect of different spent media or fresh LB-MOPS on biofilm formation by *E. coli*. Inset: crystal violet staining of PVC wells from which planktonic cell pellets or supernatants from 24 h aerobically (a) or 48 h anaerobically (b) growing cultures were harvested. Mixture of cell pellets with different supernatants was carried out as indicated. Biofilm formation was quantified after further 24 (aerobic, +O₂, top row) or 48 h (anaerobic, -O₂, bottom row). The experiment was repeated at least three times with similar results. Results from a typical experiment are shown.

Interestingly, a marked decrease in biofilm formation was observed when supernatants from aerobic cultures were used regardless of the origin of the cell pellets compared to the wells where supernatant from anaerobically-grown cultures or fresh medium were used (Fig. 5), suggesting the presence of a signal(s) molecule(s) that interferes with this process. This is in good agreement with previous results [7].

Recent analyses of extracellular signaling revealed that *E. coli* does not produce homoserine lactones [21]. However, *E. coli* does produce the autoinducer-2 (furanosyl borate diester, a product of the enzyme LuxS) that has been regarded as a "universal" cell-cell communication signal [46]. We then decided to check whether a strain defective in the production of the autoinducer-2 (strain DH5 α ; [38,39]) was able to form biofilm and whether or not this strain displayed the same biofilm formation kinetics as the W3110 strain. Strain DH5 α (*luxS*) was not affected in its ability to form biofilms nor did it display different biofilm formation kinetics from that of W3110. Moreover, this strain was not able to form biofilm anaerobically. It is thus very likely that autoinducer-2 is not involved in the biofilm process, at least under our experimental conditions (data not shown). This is in good agreement with previous results showed by Reisner et al. [31].

3.5. Swarming motility under anaerobic conditions

It has been reported that swarming motility and flagella are required for the early stages of biofilm development in *E. coli* [26,30]. Consistent with this, *flhC*, *flhD*, *motA* and *motB* mutant strains are severely defective in biofilm formation [30]. We wondered whether the reason for the lack of biofilm formation under anaerobic growth conditions was the result of a defective or null motility or defective flagella production. Therefore we tested the motility of strain W3110 on swarming plates supplemented with 0.2% glucose under

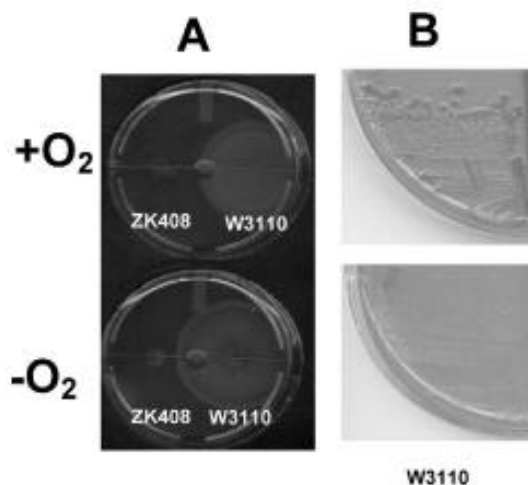


Fig. 6. Motility and type 1 pili production under aerobic or anaerobic culture conditions. (A) *E. coli* swarming motility assays under aerobic or anaerobic conditions. Strains W3110 (wild type) and ZK408 (*flhC*) were spotted onto soft tryptone motility plates supplemented with 0.2% glucose and incubated under aerobic (+O₂) or anaerobic (-O₂) growth conditions for 8 and 12 h, respectively. (B) To check for the presence of type 1 pili, strain W3110 was streaked on Congo red plates and incubated aerobically (+O₂) or anaerobically (-O₂) for 72 h at 28 °C.

aerobic or anaerobic conditions. As shown in Fig. 6A, normal levels of motility were exhibited under anaerobic growth conditions. Mutant strain ZK408 (*flhC*) defective in the synthesis of flagella was used as a negative swarming control (Fig. 6). Our results indicate that motility is not severely affected under anaerobic conditions and that the failure in biofilm production is not due to impaired motility.

3.6. Presence of type 1 pili under anaerobic conditions

D-mannose sensitive type 1 pili are responsible for more than 80% of the biofilm formed in microtiter plates under aerobic conditions [16,30]. In addition, type 1 pili strongly promote growth and attachment at the liquid-oxygen interface [13,29,30]. Therefore, it is very likely that the non-biofilm-forming phenotype associated with anaerobic conditions is related to a switch to a non-fimbriated population. Since the defect in biofilm formation under anaerobic conditions is not due to motility, we determined the presence of type 1 pili under anaerobic versus aerobic conditions by streaking the W3110 strain on Congo red plates. As shown in Fig. 6B, a clear difference was observed between cells grown aerobically (red) and cells grown anaerobically (white), indicating that type 1 pili were present only under aerobic growth conditions. These results suggest that one of the reasons for the failure of biofilm formation under anaerobic conditions in *E. coli* is the lack of production of type 1 pili under anaerobic conditions.

4. Discussion

The importance of bacterial biofilms is clearly evident due to their negative impact in medical, industrial and environmental settings. Molecular studies have focused on the genetic determinants of biofilm formation in different bacterial species [12,17,42]. Mutants affected in type 1 pili formation or motility are severely impaired in biofilm formation [30]. Other genetic determinants affecting biofilm formation include *rpoS*, *hns*, *rfa* and *dsbA* [1,7,15,16,22]. It is widely known that biofilm formation is affected by environmental conditions and physical factors such as pH and nutrient availability. During their first attempts to develop a method for the study of biofilms, Pratt and Kolter [30] observed that *E. coli*-formed biofilms were evident as a ring only at the air-liquid interface, suggesting an important role for oxygen in the formation of biofilms. Interestingly, the same pattern of biofilm formation was also observed in *P. aeruginosa* and *Vibrio cholerae* [28,43].

In this communication, we demonstrated that *E. coli* cannot form biofilm under anaerobic conditions on PVC microtiter dishes. Probably, this may explain why biofilm is formed as a ring mainly at the air-liquid interface of a culture. Why is oxygen required for biofilm formation in *E. coli*? Several lines of evidence suggest that oxygen per se is essential. First, apparently, no extracellular signals produced either aerobically or anaerobically modify the amounts of biofilm formation under anaerobic conditions. The use of aerobic or anaerobic spent media suggested that no signals are involved in this process (unless there was an oxygen-sensitive negative signal produced under anaerobic conditions; Fig. 5). Second, aerobically growing cells (and in a biofilm-forming status) stop biofilm formation and/or start biofilm dispersal after a shift to anaerobiosis (Fig. 2). Third, the respiratory system is not involved in this process since the presence of alternative electron acceptors such as nitrate, fumarate, nitrite and DMSO-molybdate did not support biofilm formation under anaerobic respiratory conditions (Fig. 4). Fourth, motility, an essential requirement for biofilm formation, is not severely affected by the absence of oxygen (Fig. 6).

Availability of oxygen is critical for triggering the synthesis of a high number of proteins involved in aerobic or anaerobic metabolism. Our attempts at selecting a transposon-induced or chemical mutagenesis-induced mutant with the ability to form biofilm anaerobically were unsuccessful (Colón-González, unpublished). This result may indicate that either (1) the gene responsible for a negative signal for biofilm formation under anaerobic conditions is essential, or (2) oxygen per se is essential for biofilm formation. Our results cannot rule out either of these two possibilities.

Several polysaccharide lyases, proteases and nucleases may participate in the detachment process [4]. It would be very interesting to study the pattern of expression of genes encoding any of these proteins under aerobic or anaerobic growth conditions.

Previous studies [13,16,29,30] have shown that type 1 pili are important elements for biofilm formation in *E. coli*. Our finding that type 1 pili are preferentially present under aerobic conditions (Fig. 6B) may explain why *E. coli* cannot form biofilm anaerobically. However, transcriptional DNA microarray studies comparing aerobically versus anaerobically grown cells showed no difference in expression of the *fim* operons [33]. Further studies such as overexpression of the *fim* operons under anaerobic conditions are necessary to clearly establish the role of type 1 pili in biofilm formation in the absence of oxygen.

To our knowledge, this is the first time that a chemical element which is not essential for growth is demonstrated to be essential for biofilm formation. It is important to note that *E. coli* is a facultative organism that has a fast growth rate under anaerobic respiratory conditions provided there is an alternative electron acceptor available. On the other hand, mostly aerobic organisms such as *P. aeruginosa* or *Mycobacterium tuberculosis* form biofilm in the same way as *E. coli*. The essential role of oxygen in biofilm formation in *E. coli* becomes relevant if we consider that during the course of dental plaque biofilm formation, many strict anaerobes such as *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides forsythus* require the previous attachment of an aerobe or a facultative organism to start the formation of biofilm [5,45]. Experiments are under way to determine whether extracellular signals present in anaerobic cultures of dental-plaque-forming organisms can induce biofilm formation in *E. coli* in the absence of oxygen.

Recently, Ren et al. [32] identified an exogenously produced furanone compound as a negative signal of *E. coli* biofilm formation. We cannot rule out the possibility that a similar compound may be involved in the negative regulation of biofilm formation under anaerobic conditions. Alternatively, the presence of some surface polysaccharides lyases or adhesins may be genetically regulated depending on the availability of oxygen. Experiments are under way to test this possibility. Interestingly, an alginate lyase homologue gene (*yebN*) is present in the *E. coli* chromosome. The key enigma highlighted by this study is the essential requirement for oxygen in the process of biofilm formation. Our unsuccessful attempts to isolate a mutant that lifted the oxygen requirement led us to think that oxygen may be a structural part of the biofilm complex constitution.

Acknowledgements

This work was supported by Grants J33369-N from CONACyT (Mexico), IN205200 and IN207703 from PAPIIT UNAM and 00-419 RG/BIO/LA from TWAS. M.C.-G. and M.M. M.-O. are scholars from CONACyT. We thank Laura Camarena for advice on the motility assays and Mary Berlyn and Roberto Kolter for strains used in this work. Miguel Páez Silva and Luis Delgado provided technical assistance. We are also grateful to the members of the

Membrillo-Hernández lab and to Drs. Maluye Girard and Gloria Soberón for critical comments on the manuscript. Finally we would like to acknowledge the anonymous referees for improving style and providing us with the idea of the Congo red plates.

References

- [1] J.L. Adams, R.J. McLean, Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4285–4287.
- [2] B.L. Bassler, How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 582–587.
- [3] C. Boloin, J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Fiane, M. Kzreminski, D. Balestrino, J.A.J. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille, J.-M. Ghigo, Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression, *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 659–674.
- [4] A. Boyd, A.M. Chakrabarty, Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 2355–2359.
- [5] D.J. Bradshaw, P.D. Marsh, G.K. Watson, C. Allison, Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community, *Letts. Appl. Microbiol.* 25 (1997) 385–387.
- [6] G.D. Christensen, W.A. Simpson, A.L. Bisno, E.H. Beachey, Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, *Infect. Immun.* 37 (1982) 318–326.
- [7] F.P. Corona-Izquierdo, J. Membrillo-Hernández, A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth, *FEMS Microbiol. Lett.* 211 (2002) 105–110.
- [8] F.P. Corona-Izquierdo, J. Membrillo-Hernández, Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(*N*-morpholino)propionic sulfonate (MOPS), *Res. Microbiol.* 153 (2002) 181–185.
- [9] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (1995) 711–745.
- [10] P.N. Danese, L.A. Pratt, S.L. Dove, R. Kolter, The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 424–432.
- [11] P.N. Danese, L.A. Pratt, R. Kolter, Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 3593–3596.
- [12] P.N. Danese, L.A. Pratt, R. Kolter, Biofilm formation as a developmental process, *Methods Enzymol.* 336 (2001) 19–26.
- [13] J.P. Duguid, R.R. Gillies, Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli, *J. Pathol. Bacteriol.* 92 (1957) 107–137.
- [14] L. Friedman, R. Kolter, Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms, *Mol. Microbiol.* 51 (2004) 675–690.
- [15] P. Genevoux, P. Bauda, M.S. DuBow, B. Oudega, Identification of *Tn10* insertions in the *abhA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation, *FEMS Microbiol. Lett.* 173 (1999) 403–409.
- [16] P. Genevoux, P. Bauda, M.S. DuBow, B. Oudega, Identification of *Tn10* insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion, *Arch. Microbiol.* 172 (1999) 1–8.
- [17] P. Genevoux, S. Müller, P. Bauda, A rapid screening procedure to identify mini-*Tn10* insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties, *FEMS Microbiol. Lett.* 142 (1996) 27–30.
- [18] B.D. Hoyle, J.W. Costerton, Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms, *Prog. Drug Res.* 37 (1991) 91–105.
- [19] T. Ichimiya, T. Yamasaki, M. Nasa, In vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, *J. Antimicrob. Chemother.* 34 (1994) 331–341.

- [20] D.W. Jackson, K. Suzuki, L. Oakford, J.W. Simecka, M.E. Hart, T. Romeo, Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CarA of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 290–301.
- [21] J. Jiang, M. Cámara, S.R. Chhabra, K.R. Hardie, B.W. Bycroft, A. Lazduski, G.P. Salmond, G.S. Stewart, P. Williams, In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-butanoyl-L-homoserine lactone, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 193–203.
- [22] P. Landini, A.J. Zehnder, The global regulatory *lux* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 1522–1529.
- [23] J. Membrillo-Herrández, P. Echave, E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros, E.C. Lin, Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase: Genetic and biochemical studies of the mutant proteins, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33869–33875.
- [24] J. Membrillo-Herrández, E.C. Lin, Regulation of expression of the *adhE* gene, encoding ethanol oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a downstream promoter and regulation by Fnr and RpoS, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 7571–7579.
- [25] J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- [26] G.A. O'Toole, R. Kolter, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 295–304.
- [27] G.A. O'Toole, R. Kolter, Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis, *Mol. Microbiol.* 28 (1998) 449–461.
- [28] G.A. O'Toole, L.A. Pratt, P.L. Watnick, D.K. Newman, V.B. Weaver, R. Kolter, Genetic approaches to study of biofilms, *Methods Enzymol.* 310 (1999) 91–109.
- [29] D.C. Old, J.P. Duguid, Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium, *J. Bacteriol.* 103 (1970) 447–456.
- [30] L.A. Pratt, R. Kolter, Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili, *Mol. Microbiol.* 30 (1998) 285–293.
- [31] A. Reisser, J.A. Hangensen, M.A. Schembri, E.L. Zechner, S. Molin, Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 933–946.
- [32] D. Ren, J.J. Sims, T.K. Wood, Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone, *Environ. Microbiol.* 3 (2001) 731–736.
- [33] K. Salmon, S.P. Hung, K. Mekjian, P. Baló, G.W. Hatfield, R.P. Gunsalus, Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen availability and FNR, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 29837–29855.
- [34] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [35] M.A. Schembri, K. Kjaergaard, P. Klemm, Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 253–267.
- [36] P.C. Shih, C.T. Huang, Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance, *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (2002) 309–314.
- [37] D. Stickler, Biofilms, *Curr. Opin. Microbiol.* 2 (1999) 270–275.
- [38] M.G. Surette, B.L. Bassler, Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7046–7050.
- [39] M.G. Surette, M.B. Miller, B.L. Bassler, Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 1639–1644.
- [40] S. Takada, Y. Fujisawa, M. Matsubara, H. Aiba, T. Mizuno, A novel feature of the multistep phosphorylation in *Escherichia coli*: A revised model of the ResC → YojN → ResB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 440–450.
- [41] Q.H. Tran, G. Unden, Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation, *Eur. J. Biochem.* 251 (1998) 538–543.
- [42] P.L. Watnick, R. Kolter, Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm, *Mol. Microbiol.* 34 (1999) 586–595.
- [43] P.L. Watnick, C.M. Lauriano, K.E. Klose, L. Cruzal, R. Kolter, The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139, *Mol. Microbiol.* 39 (2001) 223–235.
- [44] M. Whiteley, M.G. Bungera, R.E. Bangarner, M.R. Parsek, G.M. Teitzel, S. Lory, E.P. Greenberg, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Nature* 413 (2001) 860–864.
- [45] J. Wimpenny, in: J. Wimpenny, W. Nichols, B. Stickler, H.M. Lappin-Scott (Eds.), The Spatial Organization of Biofilm, Bioline, Cardiff, UK, 1994, p. 16.
- [46] K.B. Xavier, B.L. Bassler, LuxS quorum sensing: More than just a numbers game, *Curr. Opin. Microbiol.* 6 (2003) 191–197.