



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**La formación de biopelícula constituida por PGA y la
expresión del regulador transcripcional Ygbl en
Escherichia coli son regulados por RcsC.**

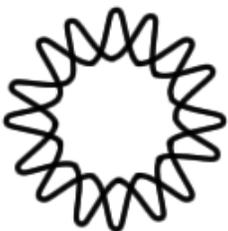
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

QFB. ROSALVA SALGADO BRAVO

Asesor de tesis:
Dr. Ricardo Oropeza Navarro



Cuernavaca, Morelos 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Ricardo Oropeza Navarro.

Para la realización del proyecto se contó con los siguientes financiamientos:

- PAPIIT/DGAPA IN205107. “Regulación de biopelículas por el sistema Rcs y análisis de sus componentes en *Escherichia coli*”. Febrero de 2007 a diciembre de 2009.
- CONACyT 98066. Convocatoria en Ciencia Básica 2008. En la modalidad de Gastos de operación. “Análisis de las vías de señalización que a partir de la histidín cinasa RcsC conducen a la formación de biopelícula en *Escherichia coli*”. Enero de 2010 a diciembre de 2012.
- PAPIIT/DGAPA IN218410. “Mecanismos moleculares de la formación de biopelícula, constituida por el biopolímero PGA, dependientes del regulador RcsC en *Escherichia coli*”. Enero de 2010 a diciembre de 2012.

La alumna contó con la beca CONACYT No. 220851 y la beca otorgada por la Unidad de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México en la modalidad de Fomento a la Graduación.

Dedicatoria.

A Dios, gracias Señor por no dejarme caer.

A mis padres Modesto y Teresa, a mis hermanos Amado, Gerardo, Daniela, Oliver y mi pequeño Suriel, porque en ustedes siempre encontré la fuerza para seguir adelante, gracias por iniciarme en el vuelo.

A mi esposo, gracias amor por entrar en mi vida en el momento exacto, gracias por enseñarme a luchar por las cosas que quiero, tu amor y apoyo incondicional fueron y serán siempre la base de mi fortaleza. Te amo.

Agradecimientos.

A mi asesor, el Dr. Ricardo Oropeza Navarro, por el tiempo y esfuerzo que dedicó a mi orientación académica, por las aportaciones y discusión de resultados que ayudaron al desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Edmundo Calva Mercado, por aceptarme en su grupo de investigación y por el apoyo brindado.

A Liliana, mi amiga incondicional y compañera de logros y penas, gracias porque juntas iniciamos este reto y en el camino nunca nos separamos.

Gracias al grupo Calva-Puente, porque más que un grupo de trabajo fueron parte de mi familia por dos años, Ismael H., Miguel Ángel, Carmen G., Ana Lucia, Magdalena W., Esteban R., Marcos F., Adrian I., Claudia S., José Luis Puente, Alejandro H., Abraham M., Aurora., Sarita, Rafael, Víctor B., Luary, Alejandra V., Verónica, Francisco S., Javier O., Rosalva G., Amapola B., y Elvira V., agradezco su apoyo y la ayuda que siempre me prestaron.

A mi comité tutorial, Dr. Daniel Genaro Segura González y Dr. Miguel Castañeda Lucio, porque en cada tutorial estuvieron al pendiente de mis avances y sus críticas siempre constructivas auxiliaron el progreso de mi proyecto.

Al comité revisor: Dr. Enrique Merino, Dra. María Brenda Valderrama, Dr. Pablo Vinuesa y Dra. Cinthia E. Núñez. Gracias por sus correcciones y comentarios que ayudaron a la mejora y correcta presentación de esta tesis.

Dr. Enrique Merino Pérez

Presidente

Dra. María Brenda Valderrama Blanco

Secretario

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

Vocal

Dra. Cinthia E. Núñez López

Suplente

Dr. Ricardo Oropeza Navarro

Suplente

Comité Revisor.

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Biopelículas.....	8
1.1.1. Formación de biopelícula.....	9
1.2. Sistemas de dos componentes.....	12
1.3. Sistema de regulador de dos componentes RcsCDB.....	14
1.3.1. Análisis de los diferentes dominios de RcsCDB.....	15
1.3.2. Las proteínas PgaABCD, encargadas de la producción de PGA..	18
1.3.3. Regulación transcripcional del operón <i>pgaABCD</i>	19
1.3.4. Regulación postranscripcional de <i>pgaABCD</i>	19
1.3.5. Ygbl; supuesto regulado transcripcional involucrado en la producción de biopelículas.....	22
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo General.....	26
3.2. Objetivos particulares.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1. Lista de oligonucleótidos y vectores de clonación utilizados.....	27
4.2. Sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC en la mutante <i>ygbl</i> ..	28
4.3. Análisis funcional de los dominios ABD de RcsC.....	29
4.4. Generación de fusiones al gen reportero <i>cat</i>	30
4.5. Clonación de <i>ygbl</i> para ensayos de complementación.....	36
4.6. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de <i>ygbl</i> y <i>ygbJ</i>	37
4.7. Clonación y purificación de Ygbl fusionada a 6xHis en su extremo carboxilo.....	40
4.8. Ensayos de unión de OmpR.....	42
4.9. Ensayos de unión de Ygbl.....	44
4.10. Ensayo de protección a la digestión con DNAsa I “DNase-I Footprint”	45

5. RESULTADOS	47
5.1. Análisis de la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC en la mutante <i>ygbI</i>	47
5.2. Análisis de las fusiones <i>pgaA-cat</i> : RcsC activa la expresión de <i>pgaA</i>	48
5.3. Caracterización de la actividad enzimática de los dominios ABD de RcsC.....	49
5.4. Análisis de los dominios ABD de RcsC en los fondos $\Delta ackA$ y $\Delta ackA \Delta ptA$	52
5.5. Ensayo de interacción OmpR- <i>pgaA</i>	53
5.6. Análisis de la fusión <i>ygbI-cat</i>	55
5.7. Ensayo de complementación de <i>ygbI</i>	56
5.8. Análisis de la fusión <i>ygbJ-cat</i>	57
5.9. Sitio de inicio de la transcripción de <i>ygbI</i> y <i>ygbJ</i>	59
5.10. Ensayos de interacción Ygbl- <i>ygbJ</i> o Ygbl- <i>pgaA</i>	61
5.11. Análisis de las fusiones <i>ygbJ, K, L, M</i> y <i>N</i> al gen reportero <i>cat</i>	63
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
7. CONCLUSIONES	69
8. PERSPECTIVAS	71
9. ANEXO	72
9.1. Análisis con microarreglos.....	72
10. REFERENCIAS	76

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biopelículas.

La mayoría de las bacterias pueden encontrarse asociadas en forma de biopelículas. Las biopelículas se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos (EPS), adheridos a una superficie inerte o tejido vivo^[27], ya sea de una sola especie o de multiespecies y que establecen relaciones y dependencias.

La composición de la biopelícula varía, dentro de cierto rango, en función del sistema bacteriano en estudio; siendo su componente mayoritario el agua, llegando a representar hasta un 97% del contenido total. La matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos con arquitectura dinámica, que presenta canales para el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, aunque dentro de la biopelícula la concentración de éstos y el pH es diferente a la del medio externo^[33]. Las sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) bacterianas, involucradas en el desarrollo de la biopelícula, son altamente variables en su composición química y pueden incluir polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos^[33].

Las biopelículas pueden resultarnos perjudiciales o benéficas. De tal modo que podemos encontrarlas contaminando implantes, corroyendo el casco de los barcos, ocasionando placa dental, etc., pero también alrededor de las raíces de plantas, como microbiota normal de nuestros intestinos o en los filtros utilizados en la depuración de aguas residuales.

Al examinar ecosistemas microbiológicos, con énfasis en sistemas con alto grado de eficiencia fisiológica (como el que se encuentra en el intestino de rumiantes), encontramos que estas comunidades están formadas por biopelículas complejas. Dicha eficiencia, en el crecimiento en forma de biopelícula, es óptima cuando las comunidades bacterianas pueden colonizar sustratos que contienen

nutrientes insolubles (por ejemplo celulosa) y exitoso cuando las células pueden establecer procesos digestivos de diferentes especies con la matriz comunal^[33].

1.1.1. Formación de biopelícula.

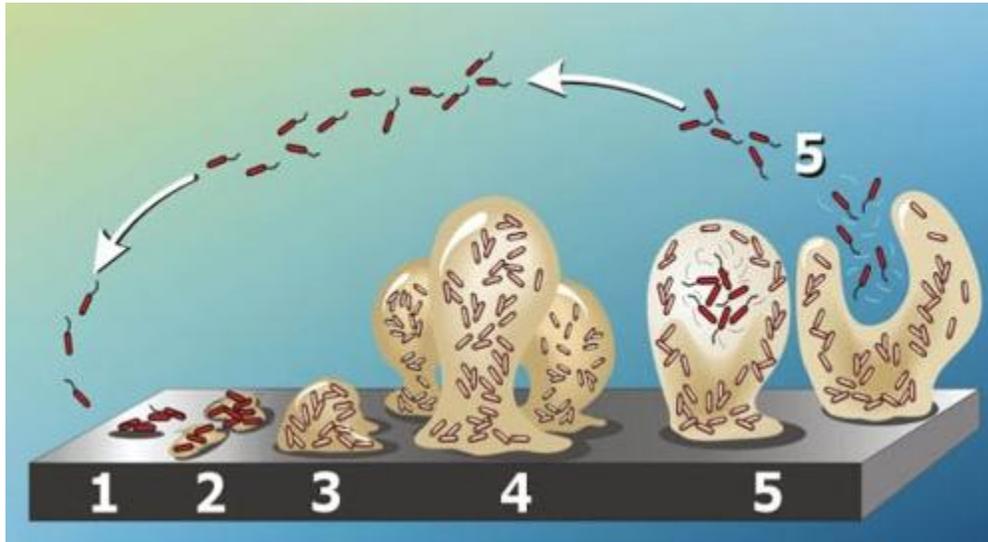


Figura 1. Diagrama que muestra el desarrollo de la biopelícula en un proceso de cinco estadios. 1: Adherencia inicial. 2: Adherencia permanente. 3: Desarrollo de microcolonias. 4: Maduración. 5: Dispersión ^[33].

La forma de crecimiento en biopelículas representa un estilo de vida alternativo con respecto al crecimiento planctónico y consiste en un proceso de desarrollo que implica expresión génica diferencial e importantes cambios fisiológicos el cual se ha descrito en cinco pasos (figura 1):

1. Adherencia inicial.

Las células se adhieren a una superficie sólida de forma reversible. En condiciones normales, las bacterias serían repelidas por la superficie pero el área puede ser acondicionada al adsorber solutos que modifican sus propiedades. En bacterias Gram-negativas, incluyendo *Escherichia coli*, se ha reportado que el flagelo y las fimbrias de tipo I, IV y el curli son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad ayuda al proceso, sin embargo no parece ser un requisito esencial^[27].

2. Adherencia permanente o irreversible.

Se caracteriza por la transición de una interacción débil de la célula con la superficie a una unión permanente, frecuentemente mediada por la producción de SPEs^[33].

3. Desarrollo de microcolonias.

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie produce al menos una adhesina que une a las células y facilita la formación de microcolonias y la maduración de la biopelícula. Al mismo tiempo, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión.

4. Maduración.

Resulta de la generación de una arquitectura compleja, canales, poros y una redistribución de las células^[33]. Una misma especie bacteriana, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos que pasaran a formar parte de la matriz de la biopelícula^[38].

5. Dispersión.

Algunas bacterias de la matriz se liberan para poder colonizar nuevas superficies, cerrando así el proceso de desarrollo de la biopelícula^[8]. En bacterias Gram-negativas, como *Pseudomonas fluorescens*, se ha reportado que la producción de homoserin lactona juega un papel importante en este estadio al estar relacionada con la disminución de los niveles de SPEs^[1]. En algunas bacterias como *Streptococcus mutans* se ha descrito la producción de enzimas de superficie que relajan la matriz polisacárida, promoviendo la dispersión de la biopelícula ^[20].

En cada uno de los estadios descritos en el desarrollo de la biopelícula existen determinantes de superficie que juegan uno o más papeles importantes. La tabla 1 muestra una visión general de algunos de los factores cuya participación en procesos específicos han sido descritos en *E. coli*^[38]. Es difícil dilucidar la forma como contribuyen los factores y sus interacciones que ocurren durante la formación

de la biopelícula debido a que su producción es dependiente de las cepas y de la expresión de múltiples estructuras de la superficie celular, los cuales están influenciados por las condiciones ambientales.

Tabla 1.

Determinantes de superficie involucradas en la formación de biopelícula en *E. coli*.

1	Contacto con la superficie y adherencia reversible	Flagelo y movilidad
2	Adhesión irreversible	Fimbria tipo I Curli Poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina
3	Formación de microcolonia y desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula	Movilidad Curli Antígeno 43 (proteína autotransportadora) Acido colánico Poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina
4	Maduración	Acido colánico Curli Pili conjugativo
5	Dispersión	Flagelo y movilidad

La formación de biopelícula se produce en respuesta a las condiciones ambientales y está controlada por una compleja cascada de reguladores. Entre estos últimos se encuentran los sistemas de fosfotransferencia de dos componentes los cuales transducen una señal ambiental al interior de la bacteria con la finalidad de adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental [27].

1.2. Sistemas de dos componentes.

Las bacterias detectan las condiciones ambientales usando variedad de señales, que incluyen iones y metabolitos secundarios, tales como Fe^{2+} y AMPc, así como proteínas reguladoras^[6]. Tradicionalmente los sistemas de transducción de señales de dos componentes han sido considerados la cascada de señalización más importante en bacterias y constituyen el principal mecanismo mediante el cual las bacterias contienden y responden a cambios en el ambiente ^[29]. Estos sistemas están formados por un detector integral de membrana con actividad de histidín cinasa (HK, por sus siglas en inglés) el cual percibe estímulos y un regulador de respuesta (RR) específico que genera cambios en la fisiología celular al afectar la expresión de los genes^[19], pero cuya actividad es controlada por el primero. Además, existen sistemas de dos componentes híbridos que requieren dominios fosforilables adicionales, los cuales pueden estar presentes en proteínas separadas o como parte de una proteína multidominio^[3].

La química de los sistemas de dos componentes involucra tres reacciones de transferencia de un grupo fosfato las que requieren de iones divalentes como el Mg^{+2} y dos fosfoproteínas intermediarias^[32].

1. Autofosforilación: $\text{HK-His} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{HK-His}\sim\text{P} + \text{ADP}$
2. Fosfotransferencia: $\text{HK-His}\sim\text{P} + \text{RR-Asp} \leftrightarrow \text{HK-His} + \text{RR-Asp}\sim\text{P}$
3. Desfosforilación: $\text{RR-Asp}\sim\text{P} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RR-Asp} + \text{P}_i$

Una vez detectado el estímulo, la cinasa se autofosforila a partir de ATP en un residuo de histidina. El fosfato de alta energía es luego transferido a un residuo de aspártico en el regulador de respuesta (figura 2), el cual se une a las secuencias reguladoras del DNA afectando la expresión de genes ^[6.1].

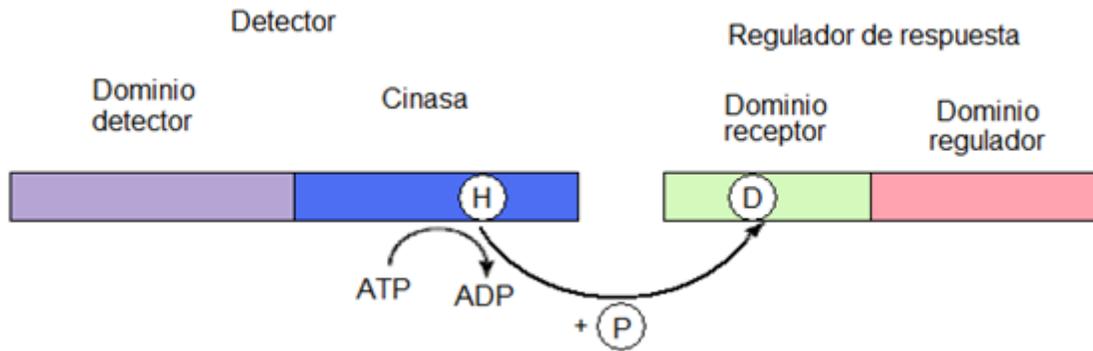


Figura 2. Esquema que muestra la organización de un sistema de dos componentes. El sistema está compuesto por una proteína detectora que transfiere un fosfato de alta energía al regulador de respuesta.

La reacción de autofosforilación ocurre entre homodímeros en los cuales un monómero de la HK cataliza la fosforilación de un residuo de histidina conservado en el segundo monómero^[32]. En muchos casos, las histidin cinasas también poseen actividad de fosfatasas, direccionando la desfosforilación de su regulador de respuesta acoplado^[17, 22].

La familia de las histidín cinasas está diversificada y la naturaleza modular de estas proteínas permite que su arquitectura individual se adapte a las necesidades específicas del sistema de señalización. Los miembros de esta familia tienen un rango de tamaño de <40 kDa a >200 kDa^[32]. Tanto las histidín cinasas como los reguladores de respuesta comprenden familias de genes parálogos y los miembros de cada familia muestran considerable similitud de secuencia y estructura. Tales similitudes crean la posibilidad de comunicación cruzada entre diferentes rutas de dos componentes, por ejemplo en los sistemas de dos componentes PhoR-PhoB y VanS-VanR, donde la histidin cinasa VanS puede fosforilar al regulador de respuesta PhoB solo en la ausencia de PhoR y de manera similar, la histidín cinasa PhoR mantiene comunicación cruzada con el regulador de respuesta VanR en ausencia de VanS^[19].

La mayoría de los sistemas de dos componentes poseen el diseño básico HK-RR que implica un solo evento de transferencia de fosfato. Las versiones más

elaboradas de sistemas de dos componentes conocidos como fosforrelivos, incluyen dominios fosforilables adicionales dentro de la misma HK o en una proteína accesoria.

1.3. Sistema regulador de dos componentes RcsCDB.

El sistema RcsCDB regula la síntesis de polisacárido extracelular de tipo ácido colánico en enterobacterias, y por lo tanto, desempeña un papel importante en la maduración de la biopelícula^[24].

La proteína RcsC es la histidín cinasa del sistema, pero además puede actuar como fosfatasa^[24] y se encuentra anclada a la membrana interna. Además del clásico dominio clásico de autofosforilación en histidina (H1), RcsC contiene un dominio receptor (D1). La presencia de este dominio extra sugiere un punto de control adicional en el sistema.

La proteína RcsD contribuye con un dominio denominado Hpt (Histidine-containing phosphotransfer) el cual cataliza la transferencia del grupo fosfato de RcsC a RcsB, el regulador de respuesta del sistema. Los dominios HPT son de alrededor de 120 aminoácidos de longitud y contienen un residuo de histidina capaz de participar en la reacción de transferencia de fosfato. Los HPT no exhiben actividad de cinasa ni de fosfatasa y sirven como módulos de comunicación entre diferentes proteínas^[37].

RcsB, el regulador de respuesta del sistema, se puede unir al DNA como homodímero^[7] o como heterodímero en asociación con RcsA^[41], la estabilidad de esta última es controlada por la proteasa Lon^[34] (figura 3). RcsB/A activan la transcripción de los genes que codifican las proteínas necesarias para la síntesis de cápsula del tipo ácido colánico (operón de 19 genes *cps*) y regula negativamente la síntesis de flagelo (operón *fhIDC*). RcsB, como homodímero, activa la transcripción de *ftsZ* (codifica una proteína esencial responsable de la formación de septo), *rprA* (codifica para un RNA regulatorio) y *osmC* (codifica para una proteína periplasmática que reduce hidroxidrogenasas orgánicas). Fredericks et al., sugirieron

que bajo ciertas condiciones, el acetyl fosfato provee directamente el grupo fosfato a RcsB independiente de RcsC y RcsD, mientras que la actividad de fosfatasa de RcsC (con RcsD) remueve el fosfato^[10].

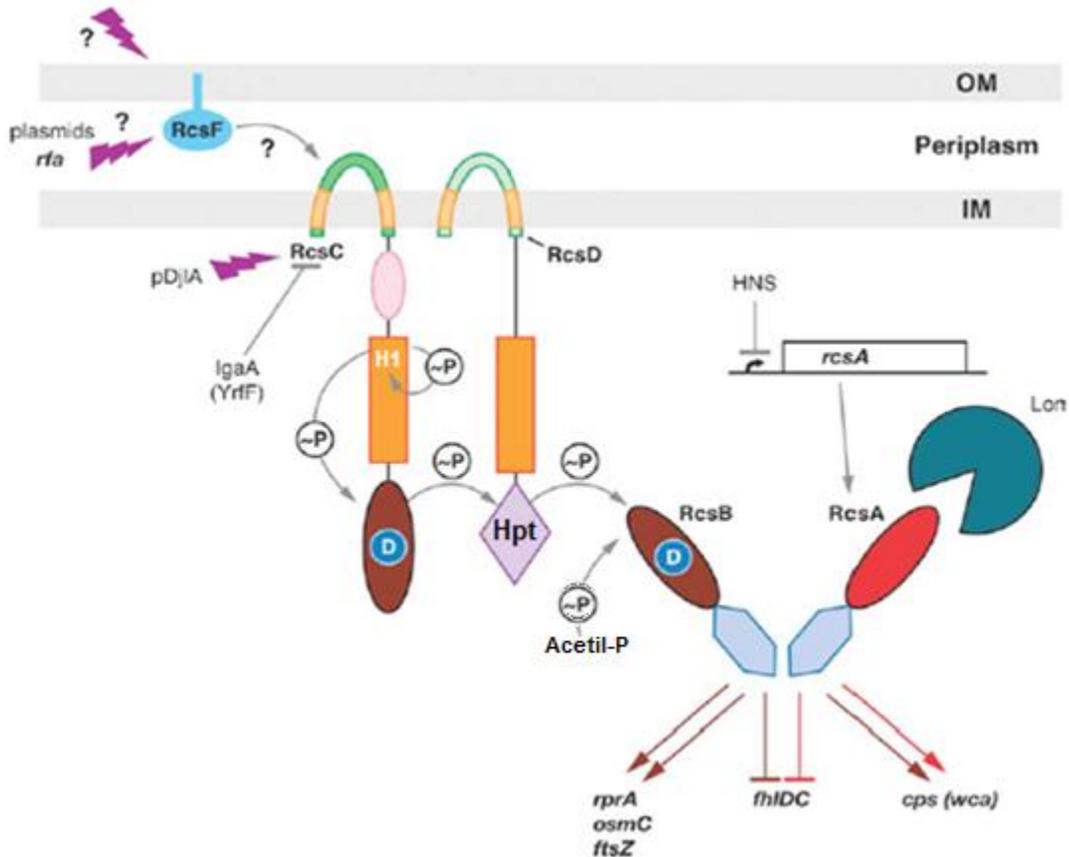


Figura 3. Modelo de la ruta de señalización del sistema RcsCDB. El fosfato es transferido de RcsC a RcsD y posteriormente a RcsB. Las flechas dentadas indican señales que vienen del exterior de la célula, perturbaciones en la superficie y periplasma, así como del resultado de la mutante en *rfa* o ciertos plásmidos, o por la sobreproducción de DjIA que conducen a la activación de la señalización de RcsC. IgaA regula negativamente la actividad de RcsC. HNS regula negativamente la transcripción de *rscA*; La proteasa Lon degrada a RcsA, la cual es una proteína de unión a DNA no regulada por fosforilación, que se une a RcsB para activar la transcripción de los genes del polisacárido extracelular y para reprimir a los genes de la síntesis de flagelo^[24].

1.3.1. Análisis de los diferentes dominios de RcsC.

Hasta apenas hace 10 años se consideraba el sistema RcsCDB como de siseño simple ya que solo incluía a las proteínas RcsC y RcsB. Fue en el año 2001 (Takeda et al.) cuando se reportó que el gen hasta entonces denominado *yojN* codifica para una proteína que aporta el componente Hpt de este sistema. Por lo

anterior, nos pareció importante abordar el estudio de las proteínas que componen este sistema con cierto detalle.

RcsC, la histidín cinasa del sistema RcsCDB es una proteína de 949 aminoácidos. Basándonos en alineamientos de RcsC con otras proteínas detectoras, la subdividimos en varios dominios, como se indica en la figura 4. Con la finalidad de analizar el papel que desempeñan cada uno de los dominios de RcsC, se transformaron al fondo silvestre y $\Delta rcsCDB$ de *E. coli* K12 BW25113, plásmidos que codifican cuatro diferentes juegos de los dominios de RcsC: PLAB, LAB, AB y ABD (figura 4).

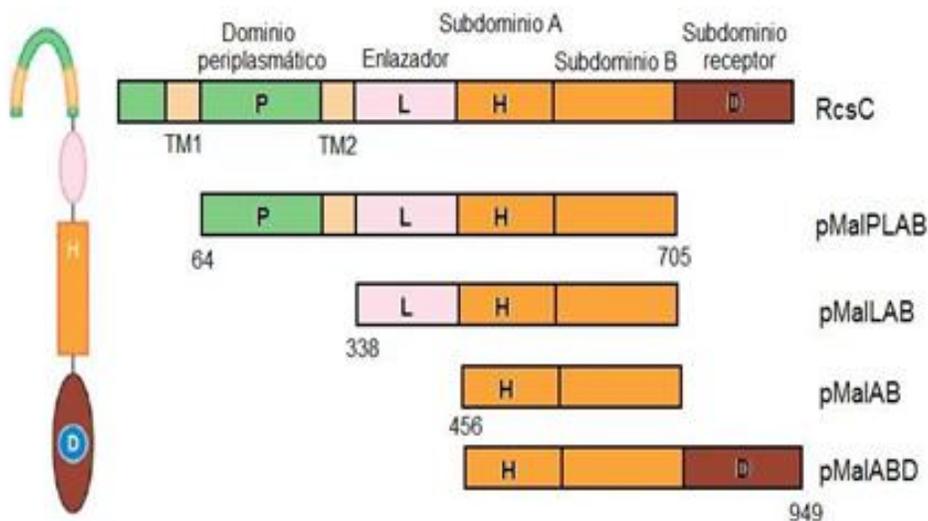


Figura 4. Representación de los dominios de RcsC y los dominios clonados donde “P” es el dominio periplasmático, “L” el enlazador, “A” el dimerizador y de fosforilación en histidina, “B” el subdominio de unión a ATP y “D” el subdominio receptor. Las proteínas se expresan como proteínas fusionadas a MBP (Maltose binding protein) bajo el control de un promotor inducible por IPTG.

Al sobreexpresar los dominios de RcsC, se encontró mediante ensayos de cuantificación de biopelícula por tinción con cristal violeta en microplacas, que la expresión de las proteínas de fusión codificadas en estos plásmidos ocasiona la producción de diferentes cantidades de biopelícula, siendo mayor la inducida por la expresión de los dominios ABD. La biopelícula formada es robusta y se puede observar a tiempos cortos (desde las 4 horas) y no se encontró diferencia en la cantidad de biopelícula producida dependiente de los fondos genéticos silvestre y

ΔrcsCDB [Ricardo Oropeza, datos no publicados]. Este resultado alude que la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC proporciona a la bacteria la capacidad de formación de biopelícula en condiciones de crecimiento que antes no eran permisivas.

Al analizar, sobreexpresando los dominios ABD de RcsC, una colección de mutantes en diversas estructuras extracelulares y rutas biosintéticas (tabla 2), se encontró que la capacidad de formación de biopelícula se perdió en la mutante en el operón *pgaABCD*, lo que dependencia por poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA). Este dato nos sugiere la existencia de una ruta alterna de señalización hacia *pgaABCD*, dependiente de RcsC pero independiente del resto del sistema de fosfotransferencia.

Tabla 2. Lista de cepas mutantes en rutas biosintéticas y estructuras extracelulares ensayadas.

Gen	Función	Formación de biopelícula	
		Sin sobreexpresar RcsC	Sobreexpresando RcsC
<i>csgD</i>	Regulador de los genes del curli.	No	Si
<i>bcsA, bcsB, bcsZ, bcsC</i>	Ruta biosintética de celulosa.	No	Si
<i>cpsC, cpsD, cpsE</i>	Ruta biosintética del ácido colánico.	No	Si
<i>fliC</i>	Subunidad de la flagelina.	No	Si
<i>mota</i>	Componente del motor flagelar.	No	Si
<i>Flu</i>	Adhesina no fimbrial Ag43.	No	Si
<i>tatB</i>	Componente de un sistema de translocación de proteínas independiente del sistema sec.	No	Si
<i>wcaA, wcaF</i>	Ruta biosintética del ácido colánico.	No	Si
<i>yaiP</i>	Glucosil transferasa no caracterizada.	No	Si
<i>ydhQ</i>	Proteína de membrana externa con motivo similar a pertactina, parecida a la familia de proteínas autotransportadoras.	No	Si
<i>pgaA, pgaB, pgaC, pgaD</i>	Ruta biosintética de la poli-β-1,6-N-acetil-D-glucosamina.	No	No
<i>nhaR</i>	Regulador transcripcional del operón <i>pgaABCD</i> .	No	No

1.3.2. Las proteínas PgaABCD, encargadas de la producción de PGA.

PGA es un homopolímero lineal de glucosamina que funciona como adhesina para el mantenimiento y estabilidad estructural de la biopelícula de diversas eubacterias^[15]. El PGA, originalmente descrito en *Staphylococcus epidermidis* donde su síntesis requiere del operón *icaADBC*^[23] fue aislado posteriormente de *E. coli* donde se demostró que su producción depende del operón *pgaABCD*^[40].

Ensayos de alineamiento de secuencia y predicción de estructuras sugieren que PgaA contiene dominios de porina, los cuales podrían facilitar la exportación del PGA a través de la membrana externa; además posee un dominio periplasmático que puede mediar interacciones proteína-proteína, tal vez en cooperación con PgaB^[15]. PgaB se encuentra anotada en las bases de datos como lipoproteína de membrana externa y contiene un dominio de N-deacetilasa similar al de IcaB cuya actividad ha sido demostrada^[15].

PgaC e IcaA son glucosiltransferasas necesarias para la polimerización de la PGA y aparentemente homólogas (figura 5). En *S. epidermidis* la correcta producción de PGA requiere de las proteínas IcaC e IcaD, pero no se ha encontrado similitud a nivel de secuencia con las proteínas Pga de *E. coli*.

PgaD es una proteína citoplasmática (137 a.a.), de la cual, mediante alineamiento de secuencia, se predijo que contiene un dominio funcional que ayuda a las glucosiltransferasas en la polimerización del PGA de otras bacterias Gram-negativas^[15].

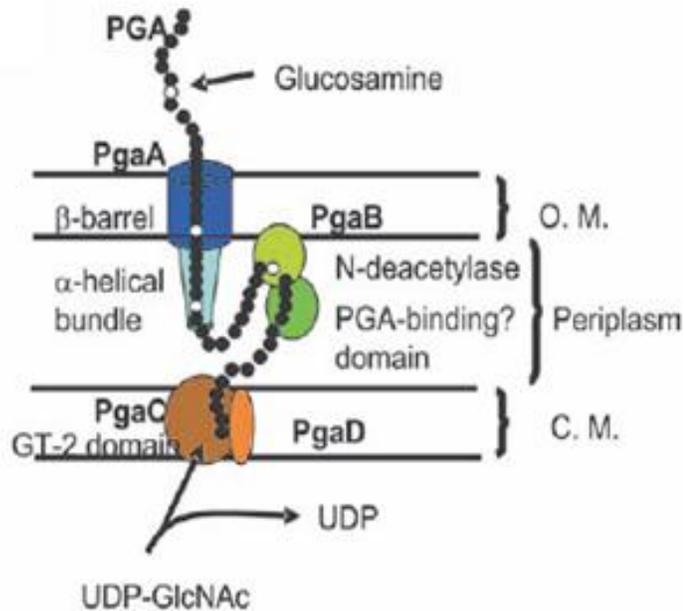


Figura 5. Modelo que esquematiza la síntesis de PGA, donde PgaC y PgaD son necesarias para la síntesis de PGA y las proteínas de membrana externa (PgaA y PgaB) se encargan de la exportación.

1.3.3. Regulación transcripcional del operón *pgaABCD*.

La transcripción del operón *pgaABCD* es regulada positivamente por NhaR, una proteína de unión a DNA perteneciente a la familia LysR de reguladores transcripcionales. El gen *nhaR* se localiza en un operón de dos genes, *nhaAR*, que es inducido por la presencia de cationes monovalentes. NhaR autoregula negativamente la transcripción de este operón^[12].

1.3.4. Regulación postranscripcional de *pgaABCD*.

El operón *pgaABCD* se regula a nivel postranscripcional por el sistema Csr (Carbon Storage Regulator). El sistema Csr controla muchos procesos biológicos en *E. coli*, incluyendo síntesis de glucógeno, glucólisis, movilidad y formación de biopelícula^[5, 16, 21, 39, 42]. Sus homólogos han sido encontrados en más de 176 procariontes. Este sistema está formado por CsrA, una proteína de 61 aminoácidos; dos RNAs pequeños no-codificantes, CsrB y CsrC; y la proteína CsrD.

CsrA es una proteína de unión a RNA que evita la traducción del mRNA de genes específicos al unirse a sitios cercanos a la secuencia Shine-Dalgarno, de tal forma que bloquea la unión a ribosoma y facilita la degradación del mRNA^[30]. También se ha demostrado que CsrA puede actuar como un regulador positivo al estabilizar e incrementar la traducción de los mRNA de genes específicos^[42]. Mediante ensayos de unión y protección (toeprinting) con RNA y CsrA se concluyó que CsrA desestabiliza el transcrito de *pgaA* al unirse a seis sitios en la región no traducida corriente arriba a la región codificante, los cuales sobrelapan con la secuencia Shine-Dalgarno^[39].

CsrB y CsrC antagonizan la actividad de CsrA al secuestrar esta proteína^[39]. La estructura predicha de CsrB muestra secuencias Shine-Dalgarno reminiscentes, siendo estos sitios el lugar de unión a CsrA; se estima que CsrB puede unir aproximadamente 9 dímeros de CsrA pero contiene 22 sitios potenciales de unión a CsrA (figura 6). La estructura secundaria predicha para CsrC es similar a la de CsrB, pero solo contiene 13 sitios potenciales de unión a CsrA^[4]. CsrD regula la degradación de los RNAs no traducidos CsrB/C al unirlos y convertirlos en sustrato para la degradación por RNase E^[35].

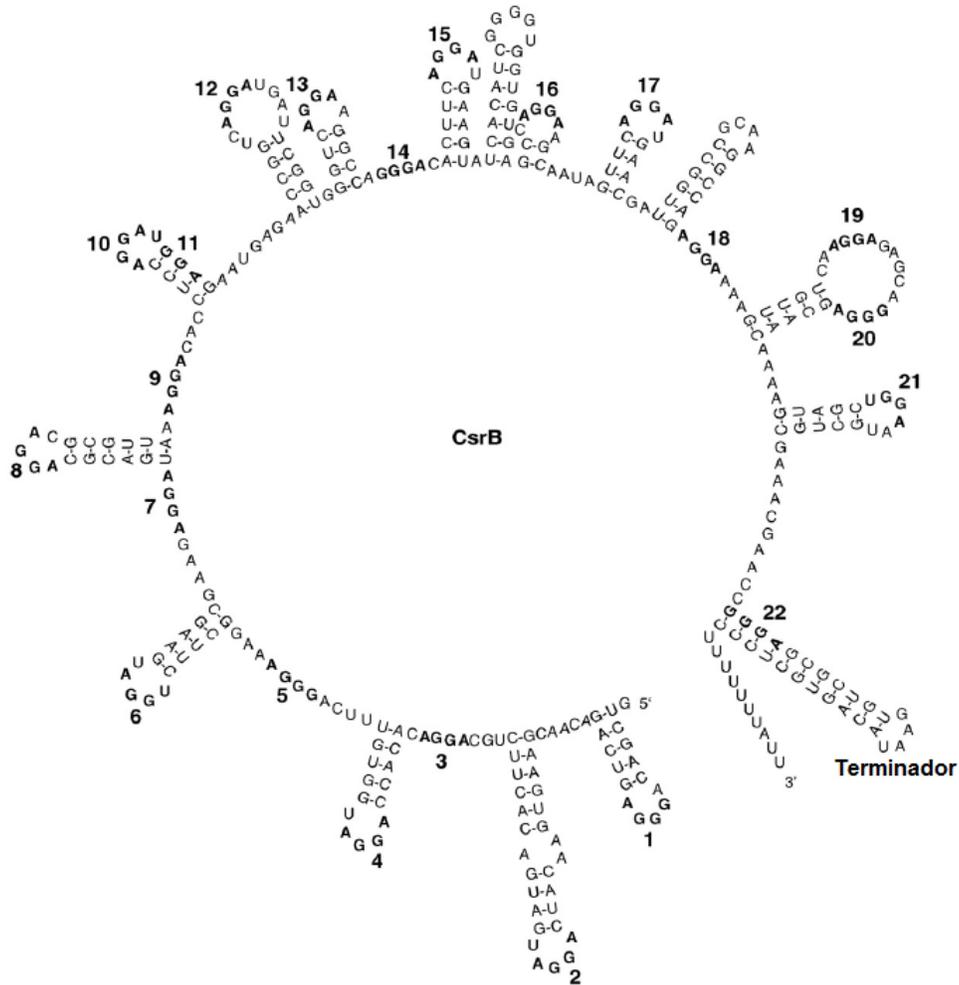


Figura 6. Estructura secundaria predicha para CsrB de *E. coli*. Las secuencias que contienen los motivos GGA se muestran numeradas y resaltadas en negro (1-22). Aunque se supone que la mayoría de estas secuencias constituyen auténticos sitios de unión a CsrA, algunas de estas repetidas probablemente se encuentran muy cercanas como para ser reconocidas por CsrA. También se muestra la horquilla de terminación^[4].

La transcripción de estos RNAs no-codificantes es regulada por el sistema de dos componentes BarA/UvrY, el cual activa la expresión de CsrB/C resultando en el secuestro de CsrA y por consiguiente en la desrepresión de genes específicos (figura 7)^[13, 35, 36].

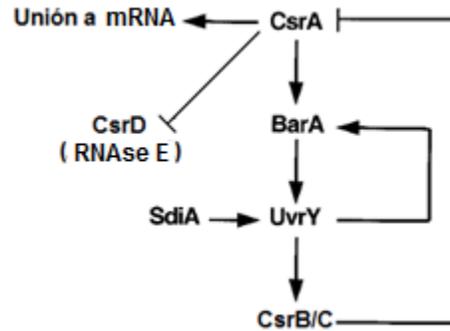


Figura 7. Circuito regulador de Csr. CsrA indirectamente activa la transcripción de *csrB/C*; este efecto requiere la funcionalidad de UvrY, el cual activa directamente la transcripción de *csrB*; también está mediado en parte por la activación de la expresión de *barA*. UvrY activa la expresión de *barA* a forma de autorregulación. SdiA activa la expresión de *uvrY* y por consiguiente de *csrB/C*.

1.3.5. *YgbI*; supuesto regulador transcripcional involucrado en la producción de biopelículas.

Se determinó que la sobreexpresión de los dominios ABD de la histidin cinasa RcsC promovían la producción de biopelícula dependiente de PGA e independiente de RcsD y RcsB. Con la intención de encontrar un activador transcripcional que de manera indirecta completara el sistema de señalización de RcsC hacia el operón *pgaABCD* se realizaron análisis con microarreglos, sobreexpresando la construcción MBP-ABD de RcsC, los cuales evidenciaron la expresión 119 reguladores de transcripcionales (ver anexo 9.1). Se tomó como referencia la intensidad neta de *rscC* (13931.738) ya que este fue el gen que se estaba sobreexpresando y se eligió el gen cuya intensidad neta fuera la más cercana a nuestra referencia: *ygbI* (9983.199) [Ricardo Oropeza, datos no publicados].

El gen *ygbI* codifica para una proteína no caracterizada predicha por estudios de similitud de secuencia como un regulador transcripcional de la familia DeoR^[28]. En *E. coli* K12, la familia DeoR contiene por lo menos 14 miembros; la mitad de ellos solo han sido identificados solamente con base en similitud de secuencias mientras que el resto han sido parcialmente caracterizados (tabla 3).

Los reguladores de esta familia usualmente actúan como represores en el metabolismo de azúcares^[9] y en muchos casos el inductor es un azúcar fosforilado.

Tabla 3. Miembros de la Familia DeoR encontrados en las bases de datos del genoma de *E. coli* K12

Regulador	Act (A) / Rep (R)	Operón que regula	Vía metabólica	Configuración activa de la proteína
UlaR	R	<i>ulaG-ulaABCDEF</i>	L-ascorbato	Tetrámero
DeoR	R	<i>deoCABD</i>	Deoxirribonucleósido	Octámero
GlpR	R	<i>glpGE</i>	Glicerol-P	Tetrámero
FucR	A	<i>fucAO</i>	L-Fucosa	---
AgaR	R	<i>agaZVWEFASYBCDI</i>	N-acetilgalactosamina	Tetrámero
GatR	---	<i>gatDCBA</i>	Galactiol	---
GutR (SrlR)	R	<i>srIAEBD</i>	Glucitol	---
SgcR	---	---	---	---
YdjF	---	---	---	---
YgbI	---	---	---	---
YihW	---	---	---	---
YciT (DeoT)	---	---	---	---

Las proteínas tipo DeoR exhiben, entre sus características comunes un alto grado de conservación en el tamaño con rangos de 240-260 aminoácidos^[9]. Sus dominios están altamente organizados: un dominio detector en el C-terminal que se une al inductor y a menudo actúa como un dominio oligomerizador y un dominio N-terminal que posee el motivo de unión a DNA (hélice-vuelta-hélice). Los represores de la familia DeoR se unen a varios sitios dentro del operador de las regiones promotoras en los genes que regulan con una amplia variedad de configuraciones^[11] y a menudo actúan controlando genes codificados de manera divergente al gen del regulador. La proteína DeoR se une cooperativamente generando una horquilla en el DNA que es necesaria para la represión completa^[2].

El gen *ygbI* se encuentra en posición divergente a otros 5 genes *ygb*: *ygbJ*, *ygbK*, *ygbL*, *ygbM* y *ygbN* (figura 8), los cuales podrían encontrarse formando un

operón. Las proteínas codificadas por estos genes han sido predichas como una deshidrogenasa por la presencia de un dominio de unión a NAD-P tipo Rossmann, una proteína conservada, una aldolasa, una isomerasa y una permeasa, respectivamente.



Figura 8. Diagrama que muestra la organización de *ygbI* y el posible operón *ygbJKLMN*.

2. HIPÓTESIS.

La sobreexpresión de RcsC en *Escherichia coli* activará la transcripción del regulador Ygbl y este ultimo regulará directamente al operón *pgaABCD* responsable de la formación de biopelícula de tipo PGA.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar el posible efecto regulador de RcsC sobre la formación de biopelícula dependiente de PGA y sobre la expresión del regulador transcripcional Ygbl caracterizando la probable regulación de Ygbl sobre el operón *pgaABCD*.

3.2. Objetivos particulares

- Caracterizar la función de los dominios ABD de RcsC.
- Indagar sobre un posible regulador de respuesta que relacione directamente a RcsC con el operón *pgaABCD*.
- Analizar el papel que desempeña Ygbl en la formación de biopelícula.
- Caracterizar la región mínima de regulación y el inicio de transcripción *ygbI*.
- Caracterizar la región mínima de regulación y el inicio de transcripción de *ygbJ*, dependiente de Ygbl si existiera tal filiación.
- Elucidar si los genes *ygbJ-N* constituyen un operón.
- Identificar los nucleótidos relevantes para la actividad mediada por Ygbl en la región promotora de *ygbJ*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lista de oligonucleótidos y vectores de clonación utilizados.

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados

No.	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Posición*
1	pgaABamHF	GATAGGT GGATCC TGGAACAACTTCC	1088773 a 1088798
2	pgaAHinD1R	CAATGATGAG AAGCTT CAGGAATACG	1089273 a 1089298
3	pgaAHinD2R	GGTTTTCGGG AAGCTT TTTTCTGCTAC	1089499 a 1089524
4	ygbIBamH2F	CATCACATCCAGCG GGATCC	2858367 a 2858386
5	ygbIHinDR	CCTTTTT AAGCTT CCATCTCAAGG	2859218 a 2859241
6	ygbJBamH1	GCACAAC GGATCC CTGCTG	2859106 a 2859124
7	ygbJHind	CCCATTGACCCT AAGCTT ACG	2859484 a 2859504
8	ygbKBamHI	CCGTGCGGG GGATCC CGC	2860051 a 2860067
9	ygbKHind	GCGCGTTTT AAGCTT ATCACC	2860494 a 2860515
10	ygbLBamHI	GCTCTCC GGATCC TGCTCTC	2861118 a 2861137
11	ygbLHind	GCAGCGA AAGCTT GCCAGCCG	2861706 a 2861726
12	ygbMBamHI	GGGCAATCT GGATCC GCAGC	2861873 a 2861892
13	ygbMHind	GGCG AAGCTT CAATAAAAGGC	2862302 a 2862323
14	ygbNBamHI	CGCTGGCGA GGATCC TGAACGG	2862587 a 2862608
15	ygbNHind	GCAACAGCA AAGCTT ACGCCAGC	2863156 a 2863177
16	YgbINcol	GCGTA CCATGG CAGCAGGACAAAGG	2859152 a 2859176
17	YgbIPstI	CCTGTTGATCG CTGCAG AAATGG	2860157 a 2860180
18	YhcFNcol	GGCA CCATGG ACAATGTAAATTAATG	3364348 a 3364968
19	YhcFBgIII	CCA AGATCT GCGAAGAGCTTTCC	3365725 a 3365747
20	YgbIKpnI	GGCAAATAG GGTACC ATGTCAGCAGG	2859144 a 2859169
21	YgbJPE1-1	CGGACATATGACAGTGCTGC	2859512 a 2859531
22	YgbIBgl II	GCAGG AGATCT TTTCATTTTTCGCTACC	2859938 a 2859964

Las bases marcadas en negrita indican los cambios introducidos para generar el sitio de restricción adecuado a cada enzima.

Se indican subrayados los sitios de restricción de la enzima correspondiente.

*Posición en el genoma de *E. coli* K12 sub cepa MG1655

Tabla 5. Lista de plásmidos utilizados

Nombre	Ori	Promotor	Resistencia
pMPMT6Ω	P15A	<i>bad</i>	Tc, Sp
pMPMK3	P15A	<i>Lac</i>	Km
pKK232-ΩTc	ColE1	---	Ap, Tc
pQE60	ColE1	<i>Lac</i>	Ap

4.2. Sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC en la mutante *ygbI*.

Sobreexpresamos la fusión ABD de RcsC en el fondo genético de la mutante sencilla en *ygbI* de la colección Keio^[3] y se realizó ensayo de cuantificación de biopelícula en placa de poliestireno. La temperatura de incubación fue de 30 °C y se utilizó glucosa 0.025% como represor y arabinosa 0.025% como inductor, las placas se leyeron a las 8 y 12 horas respectivamente.

Ensayo de cuantificación de biopelícula en placa de poliestireno^[31].

1. Crecer las bacterias toda la noche en 5 ml de caldo LB a 220 rpm a 37 °C.
2. Del cultivo, preparar una dilución 1:100 en LB (diluido 1:2 en agua) con el antibiótico adecuado y el inductor o represor y transferir 200 µl de esta dilución en cada uno de los pozos de la placa. Las placas se preparan por triplicado.
3. Incubar a 30 °C; una placa por 8 horas y la segunda por 12 horas.
4. Determinar el crecimiento total del cultivo, leyendo la densidad óptica a 620 nm (DO).
5. Aspirar el cultivo del pozo (sacudir fuertemente sobre papel absorbente) y lavar 3 veces con 200 µl de PBS 1X.
6. Fijar la biopelícula con 200 µl de metanol 100% durante 15 minutos. Vaciar y dejar secar 10 minutos en una estufa a 55 °C.
7. Teñir con 200 µl de cristal violeta al 2% durante 10 minutos.
8. Vaciar, enjuagar con agua tres veces y dejar secar en la estufa a 55°C durante 15 minutos.
9. Resolubilizar el colorante con 200 µl de ácido acético al 33%, dejar reposar 15 minutos.
10. Leer densidad óptica a 570nm (biopelícula).
11. Calcular la formación neta de biopelícula dividiendo las lecturas de biopelícula / DO del cultivo.

4.3. Análisis funcional de los dominios ABD de RcsC.

Con el objetivo de dilucidar si los dominios ABD de RcsC actúan como cinasa o fosfatasa, se transformó el vector vacío pMPMT6Ω y el plásmido pMPMT6ABD, que expresa los dominios ABD, en cepas que contienen fusiones cromosomales de *flhD4* o *cps* a *lacZ* proporcionadas por Alan Wolfe^[10]. Las clonas fueron analizadas para actividad de beta-galactosidasa.

Ensayo de expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*.

Las pastillas de células se resuspenden en amortiguador Z 1X.

Lectura de Proteínas.

Para determinar la concentración de proteína de las muestras se utiliza el método de Lowry.

1. Colocar 20 µl de la muestra y del control (BSA 0.2 mg/ml), en una placa de 96 pozos (por duplicado).
2. Añadir 100 µl de solución (Na₂CO₃ 3.4%, NaOH 0.17%, tartrato de sodio y potasio 1.7%, sulfato cúprico 0.85%), mezclar e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Después agregar 100 µl de reactivo de folin-ciocalteu al 16.9 %, mezclar e incubar por 30 min a temperatura ambiente.

La absorbancia de las muestras en la placa se lee en un lector para microplacas tipo Ceres (Bio-Tek). El protocolo utilizado compara la absorbancia de las muestras con una curva estándar de concentraciones de BSA, previamente establecida. La concentración de la proteína de las muestras se ajusta en un intervalo de 0.15 a 0.3 mg/ml. Una vez ajustada la muestra, se analiza la actividad de β-galactosidasa.

Actividad β-galactosidasa.

1. Se colocan 20 µl de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos.

2. Se agregan 100 μ l de solución (agua destilada, amortiguador Z 1.6%, lisozima 0.22 mg/ml, Triton 0.22%, β -mercaptoetanol 16 mM).
3. La placa se incuba por 10 minutos a 37 °C.
4. Se agregan 100 μ l del cromógeno ONPG (o-nitrofenil β -D-galato piranosido 0.99 mg/ml de agua), que al ser hidrolizado por la enzima β -galactosidasa vira a un color amarillo.

La absorbancia de las muestras se mide en un lector tipo Ceres a 415 nm, por 5 minutos. Las lecturas se comparan con una curva estándar de actividad de β -galactosidasa, previamente establecida.

Para obtener la actividad específica, se divide el valor obtenido de la actividad de la enzima entre la concentración de la proteína de cada muestra: el valor se expresa en U/mg de proteína.

4.4. Generación de fusiones al gen reportero *cat*.

La secuencia corriente arriba de los genes *pgaA*, *yglI*, *yglJ*, *yglK*, *yglL*, *yglM* y *yglN* fueron obtenidas de la base de datos www.genome.jp del genoma de *E. coli* K12 sub cepa MG1655. A partir de ésta, se diseñaron los oligonucleótidos que las flanquean con un sitio de restricción BamHI en su extremo 5' y un sitio HindIII en su extremo 3' (tabla 4, oligonucleótidos del 1 al 15).

Los productos amplificados por PCR fueron purificados aislando las bandas de un gel de agarosa al 0.8% (haciendo uso de "PCR Purification kit" de QIAGEN). Después, se digirieron con las enzimas de restricción indicadas en una reacción estándar de la misma forma que el plásmido pKK232- Ω Tc, con el objetivo de hacer complementarios los extremos de las regiones intergénicas con los extremos del vector de clonación. Este plásmido permite generar fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* y presenta selección negativa a tetraciclina.

Las regiones intergénicas se ligaron al vector mediante una reacción estándar que se dejó en incubación 12 horas a 16 °C sin agitación. Estas ligaciones

fueron transformadas en células electrocompetentes de *E. coli* MC4100, las cuales fueron cultivadas en medio LB sólido con ampicilina.

Células electrocompetentes.

1. Inocular desde glicerol o colonia nueva a 5 ml de caldo LB e incubar toda la noche a 37 °C a 220 rpm.
2. Tomar 500 µl del cultivo e inocularlos en 100 ml de LB.
3. Incubar a 37 °C a 220 rpm hasta alcanzar una $DO_{595} = 0.6 - 0.7$.
4. Vaciar el contenido en tubos Falcon® estériles de 50 ml.
5. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
6. Desechar el sobrenadante.
7. Para lavar las células agregar 50 ml de agua MQ estéril y fría.
8. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
9. Desechar el sobrenadante y volver a lavar.
10. Resuspender la células en 5 ml de glicerol estéril al 10%.
11. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
12. Desechar el exceso de glicerol.
13. Con el glicerol que quedó, resuspender las células.
14. Hacer alícuotas de 50 µl en tubos Eppendorf® estériles de 1.5 ml.
15. Guardar las células a -70 °C.

A continuación se realizó la selección de las clonas sembrándolas por duplicado en medio LB sólido en presencia de tetraciclina o en presencia de ampicilina. Las colonias positivas se inocularon a medio LB líquido más ampicilina y se incubaron 12 horas a 37 °C a 220 rpm para después realizar la extracción del plásmido (empleando el kit “High Pure Plasmid Isolation” de “Roche Applied Science”).

Se analizó el perfil de restricción de los plásmidos utilizando la enzima EcoRI y PvuII/PstI, para así seleccionar a las clonas que contuvieran el inserto deseado. Aquellas con el perfil esperado, se mandaron a la unidad de secuenciación de

nuestro Instituto para corroborar que las regiones intergénicas clonadas fueran las indicadas y no presentaran mutaciones (tabla 6).

Tabla 6. Características de las fusiones transcripcionales generadas.

Fusión	Descripción	Características
pKK232pgaA1	Fusión de la región intergénica de <i>pgaA</i> al reportero <i>cat</i>	508 pb que abarcan desde el nucleótido 1088780 hasta 1089288. Contiene los 4 sitios de pegado de NhaR (de 1089224 a 1089183) y la región promotora de <i>pgaA</i> .
pKK232pgaA2N		734 pb que abarcan desde el nucleótido 1088780 hasta 1089514. Contiene los 4 sitios de pegado de NhaR (de 1089224 a 1089183), la región promotora de <i>pgaA</i> y la región líder no traducida que contiene los 6 sitios de pegado de CsrA.
pKK232ygbI2	Fusión de la región intergénica de <i>ygbI</i> al reportero <i>cat</i>	849 pb que abarcan desde el nucleótido 2858381 a 2859230, contiene toda la región intergénica de <i>ygbI</i> (195 pb), 42 pb dentro de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen divergente <i>ygbJ</i> (612 pb).
pKK232ygbJ1	Fusión de la región intergénica de <i>ygbJ</i> al gen reportero <i>cat</i>	388 pb que abarcan desde el nucleótido 2859113 a 2859501, contiene toda la región intergénica de <i>ygbJ</i> (195 pb), 50 pb dentro de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen divergente <i>ygbI</i> (143 pb).
pKK232ygbK	Fusión de la región intergénica de <i>ygbK</i> al reportero <i>cat</i>	450 pb que abarcan desde el nucleótido 2860059 a 2860509, contiene toda la región intergénica de <i>ygbK</i> (0 pb), 153 pb dentro de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbJ</i> (297 pb).
pKK232ygbL	Fusión de la región intergénica de <i>ygbL</i> al gen reportero <i>cat</i>	593 pb que abarcan desde el nucleótido 2861125 a 2861718, contiene toda la región intergénica de <i>ygbL</i> (91 pb), 104 pb dentro de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbK</i> (398 pb).
pKK232ygbM	Fusión de la región intergénica de <i>ygbM</i> al reportero <i>cat</i>	429 pb que abarcan desde el nucleótido 2861882 a 2862311, contiene toda la región intergénica de <i>ygbM</i> (4 pb), 54 pb dentro de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbL</i> (371 pb).
pKK232ygbN	Fusión de la región intergénica de <i>ygbN</i> al gen reportero <i>cat</i>	573 pb que abarcan desde el nucleótido 2862596 a 2863169, contiene toda la región intergénica de <i>ygbN</i> (88 pb), 47 pb de su marco de lectura y parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbM</i> (438 pb).
pKK232ygbKL	Fusión de las regiones intergénicas de <i>ygbK</i> y <i>ygbL</i> al gen reportero <i>cat</i>	1659 pb que abarcan desde el nucleótido 2860059 a 2861718, contiene parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbJ</i> (297 pb), toda la región intergénica (0 pb) y codificante (1167 pb) de <i>ygbK</i> , así como la región intergénica de <i>ygbL</i> (91 pb) y 104 pb de su región codificante.

pKK232ygbLM	Fusión de las regiones intergénicas de <i>ygbL</i> y <i>ygbM</i> al gen reportero <i>cat</i>	1186 pb que abarcan desde el nucleótido 2861125 a 2862311, contiene parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbK</i> (398 pb), toda la región intergénica (91 pb) y codificante (639 pb) de <i>ygbL</i> , así como la región intergénica de <i>ygbM</i> (4 pb) y 54 pb de su región codificante.
pKK232ygbMN	Fusión de las regiones intergénicas de <i>ygbM</i> y <i>ygbN</i> al gen reportero <i>cat</i>	1287 pb que abarcan desde el nucleótido 2861882 a 2863169, contiene parte de la región codificante del gen corriente arriba <i>ygbL</i> (371 pb), toda la región intergénica (4 pb) y codificante (777 pb) de <i>ygbM</i> , así como la región intergénica de <i>ygbN</i> (88 pb) y 47 pb de su región codificante.

Las fusiones *pgaA-cat*, *ygbI-cat* y *ygbJ-cat* fueron transformadas al fondo Δ *pgaC* y después estas bacterias recombinantes fueron transformadas con el plásmido pMPMT6ABD para analizar si la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC generaban un cambio en la expresión de estos genes. Al fondo Δ *ygbI* fueron transformadas las fusiones *ygbI-cat* y *ygbJ-cat* para dilucidar si *YgbI* autoregula su expresión y la del gen divergente *ygbJ*. Finalmente se realizaron ensayos de expresión de todas las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, en el caso de aquellas que contienen el plásmido pMPMT6ABD se utilizó glucosa al 0.025% como represor o arabinosa al 0.025% como inductor.

Ensayo de expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*.

Inóculos

Inocular desde glicerol o colonia nueva a 5 ml de caldo LB e incubar toda la noche a 37 °C a 220 rpm.

Cultivos

1. En matraces de 250 ml con 100 ml de LB diluido 1:2 con agua y los antibióticos adecuados, se inoculan 500 μ l de los inóculos de toda la noche. Los matraces se ensayan mínimo por duplicado.
2. Incubar a 30 °C en baño maría en agitación a 220 rpm.

3. Monitorear la DO_{595nm} y tomar una muestra de cada matraz a $DO_{595nm} \sim 0.6$ (1.5 ml), $DO_{595nm} \sim 0.8$ (1.5 ml), $DO_{595nm} \sim 1$ (1 ml) y a las 12 horas (600 μ l).
4. Las muestras se recolectan en tubos Eppendorf® de 1.5 ml y se centrifugan 2 minutos a 12000 rpm.
5. Desechar sobrenadante.
6. Agregar 800 μ l de buffer TDTT (Tris. Ditiotreitól) y resuspender con vortex.

TDTT: Tris-HCl 50 mM pH 7.8 – DTT 30 μ M

7. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
8. Desechar el sobrenadante.
9. Resuspender las pastillas en 600 μ l de TDTT y resuspender con vortex.
10. Sonicar durante 3 minutos a intervalos de pulsos “on” 9.9 y pulsos “off” 9.9. Conforme se sonicán, colocarlas en hielo. Las puntas del sonicador se limpian con etanol entre muestra y muestra para evitar contaminaciones.
11. Centrifugar durante 15 minutos a 12000 rpm.
12. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos. Pueden mantenerse a 4 °C para hacer la lectura o guardarse a -20 °C para realizarla después.

En el sobrenadante han quedado las proteínas solubles totales de la bacteria, ya expresadas.

Lectura de proteínas totales

1. Colocar 10 μ l de cada muestra en una caja de 96 pozos, en el siguiente orden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
B	2	2	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
C	3	3	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
D	4	4	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
E	5	5	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
F	6	6	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45
G	7	7	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46
H	Bco	Bco	15	15	23	23	31	31	39	39	47	47

En el blanco colocar 10 μ l de TDTT.

2. Preparar reactivo BCA Protein Assay Kit Reagent (Thermo Scientific Pierce):

Reactivo A: BCA (ácido bicinconínico)

Reactivo B: CuSO_3

Prepararlos a una proporción 50:1 (A:B) en una probeta.

3. Agregar 200 μ l de esta mezcla a cada uno de los pozos de la placa con la pipeta multicanal.
4. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. Leer en el CERES.

Reacción BCA: las proteínas contenidas en la muestra reducen el Cu^{2+} y producen Cu^+ . El BCA reacciona con éste y da un color que es detectable a 562 nm. El color se forma debido a los enlaces peptídicos y a cuatro aminoácidos (cisteína, triptófano, cistina y tirosina).

Lectura de la actividad de CAT (enzima cloranfenicol acetil transferasa)

1. Colocar 5 μ l de cada muestra en una caja de 96 pozos de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	1	9	17	25	33	41
B	2	10	18	26	34	42	2	10	18	26	34	42
C	3	11	19	27	35	43	3	11	19	27	35	43
D	4	12	20	28	36	44	4	12	20	28	36	44
E	5	13	21	29	37	45	5	13	21	29	37	45
F	6	14	22	30	38	46	6	14	22	30	38	46
G	7	15	23	31	39	47	7	15	23	31	39	47
H	8	16	24	32	40	48	8	16	24	32	40	48

2. Disolver 0.02g de DTNB (ácido ditiobisnitrobenzoico) en 5 ml de Tris HCl 1M pH 7.8 con vortex.
3. Tomar 2.5 ml de esta mezcla y diluirlos con 22 ml de agua MQ.
4. Agregar 500 μ l de acetil CoA 0.2 mM.

5. Agregar 500 μl de cloranfenicol 0.2 mM.
6. Mezclar bien.
7. Agregar 200 μl de este reactivo a cada uno de los pozos de la placa con la pipeta multicanal. Recordar que es una reacción enzimática, por lo tanto se debe leer inmediatamente en el CERES.

Reacción CAT: CAT transfiere el acetil CoA al cloranfenicol y así lo inactiva. El CoA reducido reacciona con el DNTB y produce CoA disulfido, ácido trinitrobenzoico y tionitrobenzoico libre. Éste posee un coeficiente de extinción de 13600 a 412 nm.

Micromoles de cloranfenicol acetilado \approx 1 unidad CAT \approx 1 μmol cloranfenicol acetilado/min produce el número de unidades de enzima CAT en la curva.

Actividad específica

Dividir el valor de “mean” la media de CAT/ “mean” la media de proteínas y esto es el valor de CAT en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (cuánta proteína reportera se expresó con referencia a la proteína total de la muestra).

4.5. Clonación de *ygbI* para ensayos de complementación.

La secuencia del gen *ygbI* del genoma de *E. coli* K12 sub cepa MG1655 se localizó en la base de datos www.genome.jp y a partir de ésta se diseñaron los oligonucleótidos que permitieran amplificar la región codificante.

La región regulatoria amplificada se flanqueó por un sitio de restricción KpnI en el extremo 5' y en el extremo 3' se agregó un sitio PstI (tabla 4, oligonucleótidos 20 y 17 respectivamente).

El producto obtenido (1020 pb) se purificó cortando la banda de un gel de agarosa al 0.8% (utilizando “PCR Purification kit” de QIAGEN). Después se realizó la digestión del producto con las enzimas correspondientes en una reacción estándar.

El plásmido empleado para la clonación fue: pMPMK3 que contiene el promotor *lac* inducible por IPTG. El plásmido fue digerido con las mismas enzimas seleccionadas para el producto de PCR, con el fin de hacer complementarios los extremos del gen con los extremos del vector de clonación.

Se realizó una reacción de ligación estándar y se dejó en incubación 12 horas a 16 °C sin agitación. Después esta reacción fue transformada en células *E. coli* electrocompetentes MC4100 y fueron crecidas en medio LB sólido con su respectivo antibiótico 12 horas a 37 °C.

Se eligieron colonias aisladas que se reinocularon a medio LB líquido para purificar el plásmido (empleando el kit “High Pure Plasmid Isolation” de “Roche Applied Science”) y hacer su caracterización por perfil de restricción con las mismas enzimas utilizadas para su clonación. Las clonas positivas a la selección se mandaron a la unidad de secuenciación de nuestro Instituto para corroborar que la secuencia clonada en el vector fuera la correspondiente a *ygbI* y que no contuviera mutaciones no deseadas.

El plásmido pMPMK3ygbI fue transformado a los fondos genéticos $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 y $\Delta ygbI$ pKK232ygbJ1 y se realizaron ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, utilizando IPTG 50 μ M como inductor.

4.6. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de *ygbI* y *ygbJ*.

La secuencia intergénica de *ygbI* y del gen divergente *ygbJ* del genoma de *E. coli* K12 sub cepa MG1655 fue obtenida de la base de datos www.genome.jp. A partir de estas se diseñaron los oligonucleótidos que se utilizaron en la reacción de “primer extension” o extensión del iniciador y la reacción de secuenciación (tabla 4, oligonucleótidos 5 y 21, para *ygbI* y *ygbJ* respectivamente).

La cepa $\Delta pgaC$ pKK232ygbI2 pMPMT6ABD fue crecida en medio LB líquido diluido 1:2 con agua a 37 °C a 220 rpm. Se utilizó glucosa al 0.025% como represor

y arabinosa al 0.025% como inductor y se recolectaron muestras a los tiempos en que se observó mayor actividad específica de *cat* para posteriormente extraer RNA (utilizando “RNeasy mini kit” de QIAGEN).

El RNA purificado se utilizó en las reacciones de “primer extension” como se describe a continuación:

Marcaje del oligonucleótido

1. Reacción:

Oligonucleótido 20 μ M	1 μ l
Buffer T4 PNK 10X	1 μ l
Gama P-ATP	0.5 μ l (80 μ Ci)
Agua	6.5 μ l
Enzima T4 PNK (<i>Polynucleotide Kinase</i> diluida a 3U/ μ l)	1 μ l

2. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

3. Detener la reacción incubando a 90 °C durante 5 minutos.

Reacción de hibridación y extensión

1. Reacción:

RNA (5 μ g)	18 μ l
NaCl 5 M	0.88 μ l
Tris HCl 1 M	0.66 μ l
Oligonucleótido marcado en la etapa 1	1 μ l

2. Calentar a 90 °C durante 3 minutos.

3. Añadir a la mezcla de reacción:

Inhibidor de RNAsa (a 40 U/ μ l)	0.5 μ l
Buffer de Reverso transcriptasa 5X	7.2 μ l
DTT 10 mM	3.7 μ l
dNTPs 1.25 mM	2 μ l
Agua	1.56 μ l
Enzima Reverso transcriptasa	0.5 μ l

4. Incubar a 42 °C durante 60 a 90 minutos.

5. Precipitar con n-butanol o glicógeno o algún DNA acarreador e isopropanol o alcohol absoluto.
6. Lavar con etanol al 70% en dos ocasiones.
7. Secar y resuspender en 4 μl de agua mas 8 μl de stop mix de secuencia.

Alternativamente en lugar de precipitar:

Añadir 450 μl de agua y concentrar con un Microcon 30[®] centrifugando a 14000 g durante 12 minutos. Luego de que la muestra ha pasado, se elimina el filtrado, se invierte el filtro y se centrifuga a 1000 g durante 3 minutos o hasta recuperar al menos 15 μl .

Para la reacción de secuenciación se utilizó como DNA templado el plásmido pKK232ygbI2. La reacción se realizó de la siguiente manera:

Reacción de secuenciación de DNA.

1. Rotular un juego de 4 tubos G, A, T y C.
2. Transferir 4 μl de ddGTP en el tubo marcado G. De forma similar agregar 4 μl a los tubos marcados A, T y C de ddATP, ddTTP y ddCTP respectivamente. Tapar los tubos para evitar la evaporación.
3. En un tubo Eppendorf[®] de 1.5 ml hacer la siguiente mezcla:

DNA del plásmido templado	4 μl
Agua	9.5 μl
Buffer de reacción	2 μl
Oligonucleótido marcado	1 μl
Thermo Sequenase DNA polymerase	2 μl

4. Tomar 4 μl de la mezcla y transferirlos en los tubos marcados G, A, T y C. Mezclar por pipeteo y adicionar 10 μl de aceite mineral.
5. Comenzar el programa de amplificación en el termociclador.

95 °C, 30 segundos	ó	95 °C, 30 segundos
60 °C, 60-120 segundos		55 °C, 30 segundos
		72 °C, 60-120 segundos
40-60 ciclos		

6. Cargar 4 µl en un gel de secuenciación.

4.7. Clonación y purificación de Ygbl fusionada a 6xHis en su extremo carboxilo.

La secuencia codificante del gen *ygbI* se localizó en la base de datos www.genome.jp en el genoma de *E. coli* K12 sub cepa MG1655 y a partir de ésta se diseñaron los oligonucleótidos que permitieran amplificar la región de interés.

La región codificante amplificada se flanqueó por un sitio de restricción NcoI en el extremo 5´ y en el extremo 3´ se agregó un sitio BglII (tabla 4, oligonucleótidos 16 y 22).

El producto obtenido (791 pb) se purificó cortando la banda de un gel de agarosa al 0.8% (utilizando “PCR Purification kit” de QIAGEN). Después se realizó la digestión del producto con las enzimas correspondientes en una reacción estándar.

Se eligió el plásmido pQE-60 para la clonación del producto, el cual contiene el promotor *lac* inducible por IPTG. El plásmido fue digerido con las mismas enzimas seleccionadas para el producto de PCR, con el fin de hacer complementarios los extremos del gen con los extremos del vector de clonación.

Se realizó una reacción de ligación estándar y se dejó en incubación 12 horas a 16 °C sin agitación. Después esta reacción fue transformada en células electrocompetentes *E. coli* M15[pREP4], las cuales fueron crecidas en medio LB sólido con su respectivo antibiótico 12 horas a 37 °C.

Se eligieron colonias aisladas que se reinocularon a medio LB líquido para purificar el plásmido (utilizando el kit “High Pure Plasmid Isolation” de “Roche

Applied Science”) y hacer su caracterización por perfil de restricción con las mismas enzimas utilizadas para su clonación. Las clonas positivas a la selección se mandaron a la unidad de secuenciación de nuestro Instituto para corroborar que la secuencia clonada en el vector fuera la correspondiente a *ygbI* sin contener mutaciones no deseadas.

La cepa *E. coli* M15[pREP4] pQE-60ygbI seleccionada se inoculó en matraces de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar la $DO_{600}=0.6$. Enseguida se agregó 1mM de IPTG, dejando incubar tres horas más, las células se concentraron para después purificar a YgbI:

Purificación de proteínas en condiciones nativas.

Inóculos.

1. Utilizando el vector de expresión pQE-60, se inocula la cepa de interés en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Se incuba en agitación a 37 °C toda la noche.
2. Se reinoculan 5 ml del cultivo de toda la noche en matraces con 100 ml de medio LB líquido (con los antibióticos) y se incuban en agitación a 37 °C hasta que $DO_{600}=0.6$.
3. Se induce la expresión agregando IPTG hasta la concentración final de 1 mM.
4. Se incuba 4-5 horas más.
5. Las células se concentran centrifugando a 4000 x g durante 20 min a 4 °C.
6. La pastilla de células se guarda a -20 °C toda la noche.

Buffer de unión pH 7.4: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M

Buffer de lavado pH 7.4: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 0.05 M.

Buffer de elución pH7.4: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 0.5 M

Purificación.

1. La pastilla de células se resuspende en 5 ml de buffer de unión, se agrega Triton X100 hasta 1% y se sonicán hasta claridad.
2. El lisado se centrifuga 3 min a 10 000 rpm y el sobrenadante se filtra utilizando un filtro de poro de 0.22 μ M.
3. Se agregan 10 ml de buffer de unión a una columna de agarosa-Ni y se deja equilibrar durante 5 minutos. Después se deja salir el buffer.
4. Se agrega el lisado a la columna y se deja equilibrar en agitación a 4 °C durante media hora. Se deja reposar la columna verticalmente y se abre para que pase el filtrado.
5. La columna se lava agregando 10 ml de buffer de lavado. Se repite 20 veces.
6. Se agregan 5 ml de buffer de elución y se recogen fracciones de 1 ml del flujo continuo de la columna.
7. Las fracciones se visualizan mediante SDS-PAGE y se cuantifican.
8. Guardar a -70 °C agregando algún estabilizador como glicerol al 1%.

Las fracciones obtenidas de Ygbl se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomassie. Se agregó 2% de glicerol como conservadora todas las fracciones y se almacenaron a -70 °C para ser utilizadas en ensayos posteriores. La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo de Bradford.

4.8. Ensayos de unión de OmpR.

Se amplificó la región intergénica de *pgaA* haciendo uso de los oligonucleótidos *pgaABamHF* y *pgaAHinD2R* arriba descritos. El producto de amplificación (733 pb) se purificó cortando la banda de un gel de agarosa al 0.8%; posteriormente se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para verificar que el producto se encontrara completamente puro. Como control negativo en el

experimento de unión se utilizó la región codificante de *ler*, la cual nos fue proporcionada por compañeros del grupo del Dr. José Luis Puente. Se utilizó el Nanodrop de la unidad de secuencia para cuantificar los fragmentos.

Para el ensayo se manejaron 80 ng de los fragmentos *pgaA* y *ler*, así como concentraciones crecientes de OmpR, desfosforilado y fosforilado, en ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA):

Fosforilación de OmpR.

Tabla 7. Buffer de fosforilación.		
Stock inicial	Volumen	Concentración final 5X
Tris-HCl 1M	250 µl	250 mM
KCl 1M	250 µl	250 mM
MgCl ₂ 1 M	100 µl	100 mM
Agua	400 µl	---

Solución de acetil fosfato: disolver 5.1 mg de acetil fosfato 500 mM en 50 µl de Tris-HCl 10 mM.

Reacción de fosforilación:

10 µl de solución de acetil fosfato

10-20 µM de OmpR (± 150 µl).

40 µl de buffer de fosforilación 5X.

Aforar a 200 µl con agua (de ser necesario).

Incubar en agitación por 3 horas a 22°C.

EMSA (Electrophoretic mobility shift assay).

Tabla 8. Buffer de unión.		
Stock inicial	Volumen	Concentración final 10X
HEPES 1M	4 ml	400 mM
NP40 100%	50 µl	0.5 %
KCl 1M	5 ml	500 mM
MgCl ₂ 1M	0.8 ml	80 mM
BSA 10 mg/ml	100 µl	
DTT 1M	100 µl	10 mM
Agua		No lleva

Las reacciones de interacción (20 μ l, volumen final) se llevaron a cabo en el buffer de unión específico durante 30 minutos a temperatura ambiente, teniendo cuidado de no moverlas.

Las muestras se cargan cuidadosamente en un gel de acrilamida al 6% (con un poco de buffer de corrimiento de DNA, no mezclar para no romper las posibles interacciones).

El corrimiento electroforético se realiza utilizando buffer TBE 0.5X a 70 volts por 3 horas 30 minutos y se visualizan utilizando tinción con bromuro de etidio.

4.9. Ensayos de unión de Ygbl.

Se utilizaron los oligonucleótidos YgbJPE1-1 y YgbIHindR, descritos en la tabla 4, para amplificar la región intergénica de *ygbJ-I*. De manera similar, para amplificar la región reguladora de *pgaA* se utilizaron los oligonucleótidos pgaABamHF y pgaAHinD2R también descritos en la tabla 4. Los productos de amplificación (306 pb y 733 pb, respectivamente) se purificaron cortando las bandas de un gel de agarosa al 0.8%; posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% para verificar que los productos se encontraran completamente puros. Como control negativo en los experimentos de unión se manejó la región codificante de *ler*. Se utilizó el Nanodrop de la unidad de secuencia para cuantificar los fragmentos.

Se hizo uso de los fragmentos *ygbJ* y *ler* (80 ng) o el fragmento *pgaA* (100 ng), así como concentraciones crecientes de Ygbl en ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Las reacciones de interacción se llevaron a cabo en el buffer de unión específico durante 30 minutos, tiempo después del cual las muestras se cargaron cuidadosamente en un gel de poliacrilamida al 6% utilizando buffer TBE 0.5X para el corrimiento electroforético. Los geles fueron visualizados utilizando tinción con bromuro de etidio.

4.10. Ensayo de protección a la digestión con DNAsa I “DNase-I Footprint”.

Los oligonucleótidos YgbJPE1-1 y YgbIHindR (tabla 4), se marcaron con Gama P32-ATP y se utilizaron en reacciones de amplificación independientes en combinación con el oligo sin marcar, para sintetizar las sondas que se emplearon en la reacción de “DNase-I footprint”.

DNase-I Footprint.

DNA	2 μ l
Oligonucleótido frío	1 μ l
Oligonucleótido marcado	2.5 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
dNTP's	1.25 μ l
Buffer	5 μ l
Taq polimerasa	0.3 μ l
Agua	36.45 μ l

Se prepara la mezcla de reacción con un volumen final de 40 μ l, utilizando diferentes concentraciones de proteína, un blanco que no contenga proteína ni sea digerido y un control que sea digerido pero no contenga proteína:

Sonda	300 000-500 000 CPM
dIdC	1 μ l
Buffer de unión	4 μ l
Proteína	concentraciones variables
Agua	cbp

Se incuba 20 min a temperatura ambiente.

Agregar 1 μ l de DNase-I he incubar por 15 segundos en hielo, detener la reacción con 16 μ l de solución de paro.

DNase-I:

MgCl ₂ 1M	10 µl
CaCl ₂ 1M	5 µl
Agua	985 µl

Tomar 24 µl de la solución y agregar 1 µl de DNase-I.

Solución de paro:

EDTA 0.5M pH 8	80 µl
NaAc 1M pH 5.5	240 µl

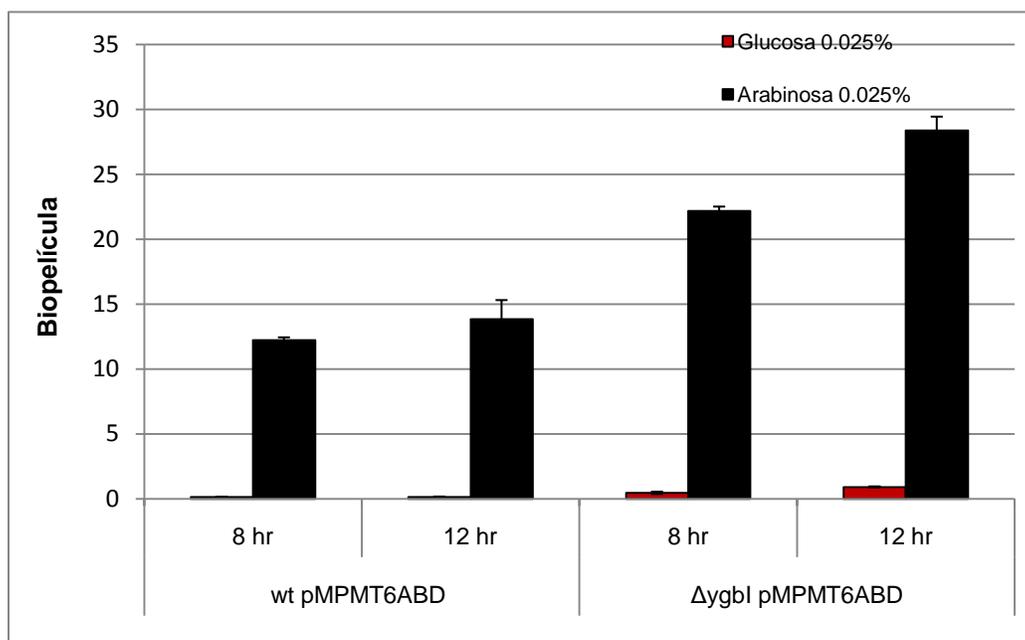
La sonda se recupera por precipitación o empleando un concentrador Microcon[®], como en el caso de la reacción de extensión del iniciador.

Los productos recuperados se analizan por electroforesis en geles de secuencia, comparándolos con el producto de una reacción de secuenciación empleando los mismos oligonucleótidos marcados.

5. RESULTADOS.

5.1. Análisis de la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC en la mutante *ygbI*.

La sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC promueva la formación de biopelícula dependiente PGA así como el incremento de la expresión del gen *ygbI*. Con la intención de encontrar una posible conexión entre el supuesto regulador transcripcional y la formación de biopelícula dependiente de PGA, decidimos sobreexpresar la fusión ABD de RcsC en el fondo genético de la mutante sencilla en *ygbI* de la colección Keio^[3]. Mediante un ensayo de cuantificación de biopelícula en placa de poliestireno, se encontró que este fenotipo estaba considerablemente aumentado (gráfica 1), sugiriendo que *ygbI* ejercen un control negativo sobre la formación de biopelícula dependiente de PGA.



Gráfica 1. Ensayo de cuantificación de biopelícula en placa de poliestireno. Las cepas fueron transformadas con el plásmido pMPMT6ABD que contiene los dominios ABD de RcsC, expresados a partir del promotor *bad*, inducible por arabinosa. Cada grupo de columnas representa a las cepas silvestre (wt) y la mutante sencilla *ygbI* crecidas en presencia de glucosa 0.025% o arabinosa 0.025%. Se prepararon dos placas procesándolas como se describe en la metodología; la temperatura de incubación fue de 30 °C y se leyeron a las 8 y 12 horas respectivamente.

5.2. Análisis de las fusiones *pgaA-cat*: RcsC activa la expresión de *pgaA*.

Análisis preliminares sobreexpresando los dominios ABD de RcsC demostraron que la formación de biopelícula se abate en una mutante que carece del operón *pgaABCD* sugiriendo que esta biopelícula es dependiente de la producción de PGA. Con el objetivo de demostrar que la sobreexpresión de RcsC activa la expresión del operón *pgaABCD* se realizaron análisis de fusiones *pgaA-cat*.

Se mandaron a secuenciar dos fusiones de diferente longitud *pgaA-cat* para descartar mutaciones: el plásmido pKK232*pgaA1* contiene sólo los sitios de pegado de NhaR (activador del operón *pgaABCD*), sin los sitios de pegado de CsrA (desestabiliza el transcrito de *pgaA*); pKK232*pgaA2N* contiene los sitios de pegado para NhaR y CsrA (figura 9).

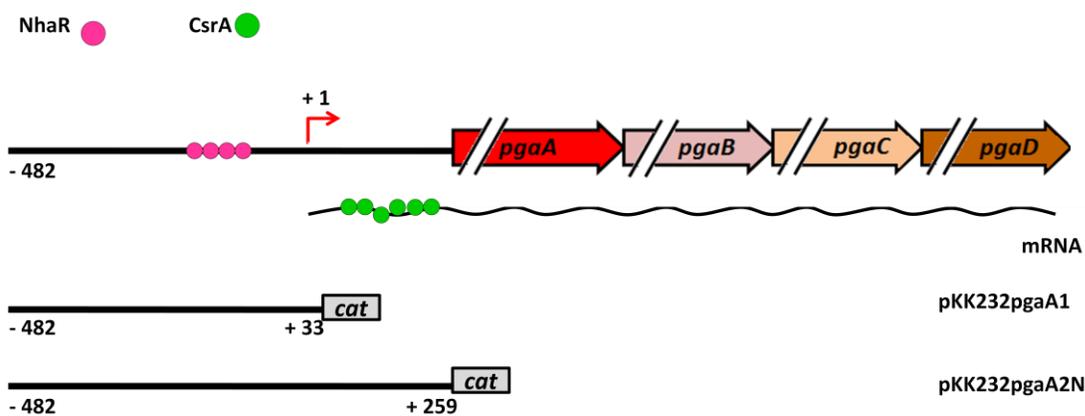
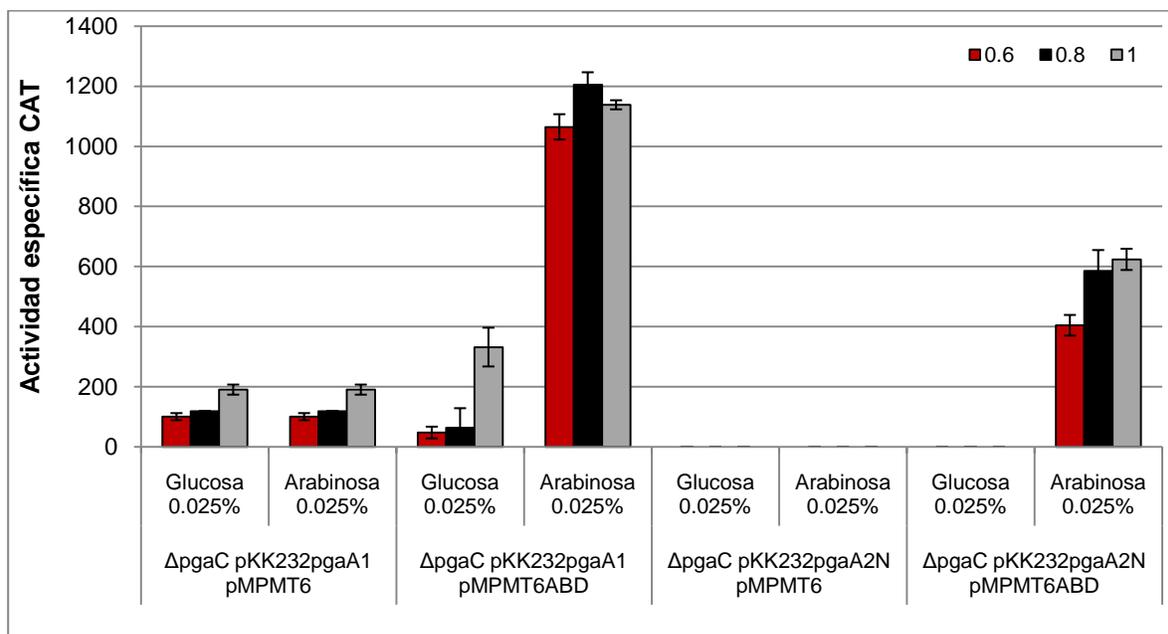


Figura 9. Diagrama que muestra de forma esquematizada regiones relevantes de las 2 diferentes fusiones transcripcionales de *pgaA-cat*. Ver texto arriba.

Las fusiones fueron ensayadas para medir actividad específica de CAT. Los ensayos se realizaron a 37 °C en medio líquido LB diluido 1:2 con agua. El medio de cultivo se usó diluido porque en ensayos anteriores se observó mejor formación de biopelícula. Se utilizó el fondo Δ *pgaC* para evitar la formación de biopelícula en

el matraz y de esta forma hacer lo más preciso posible la lectura de densidad óptica y la recolección de las muestras.



Gráfica 2. Ensayo de actividad de las fusiones *pgaA* (pKK232pgaA1 y pKK232pgaA2N) al gen reportero *cat* en los fondos $\Delta pgaC$ pMPMT6ABD y $\Delta pgaC$ pMPMT6. El ensayo se realizó a 37 °C a 220 rpm utilizando glucosa al 0.025% como represor y arabinosa al 0.025% como inductor. Las muestras fueron tomadas a $DO_{600} = 0.6, 0.8$ y 1

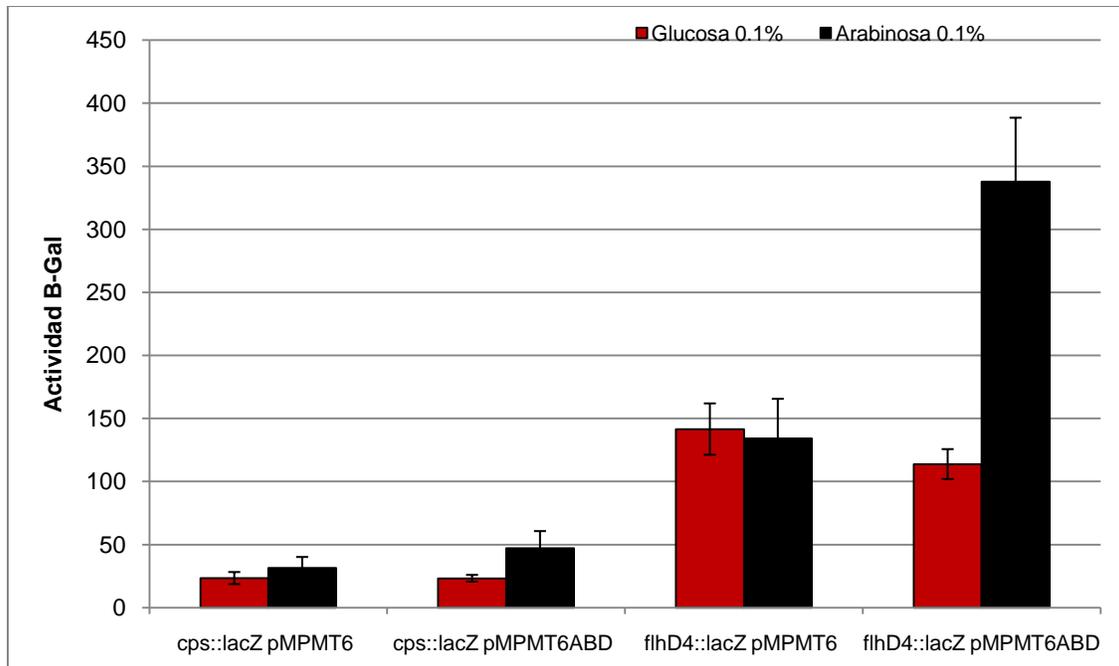
El objetivo del experimento fue evaluar la respuesta del promotor de las construcciones *pgaA1* y *pgaA2N* en respuesta a la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC clonados en el plásmido pMPMT6ABD y compararlos con el vector de expresión pMPMT6. En la gráfica 2 se observa que la expresión de las fusiones aumenta en presencia del inductor de la expresión de RcsC en el vector alrededor de 5 veces para la fusión pKK232pgaA1 y solo 3 veces en el caso de pKK232pgaA2N. Pensamos que esta diferencia proviene de la ausencia de los sitios de pegado para CsrA en la fusión *pgaA1* por lo que se estaría evitando el control postranscripcional ejercido al desestabilizar el transcrito. Estos resultados indican que la transcripción de los genes que codifican para la formación de biopelícula del tipo PGA es dependiente de la sobreexpresión de los dominios ABD de RcsC, lo cual valida los datos obtenidos del análisis por microarreglo y

concuenda con la pérdida de formación de biopelícula en las mutantes de los genes del operón *pgaABCD*.

En los ensayos de microarreglos, se detectó el incremento de expresión de *ygbI* al sobreexpresar los dominios ABD de RcsC y al realizar ensayos de formación de biopelícula sobreexpresando estos dominios en un fondo $\Delta ygbI$ el fenotipo se ve aumentado. Ya hemos definido que la biopelícula formada es dependiente de PGA. Con la intención de saber si YgbI presenta relación directa con el operón *pgaABCD* se ensayaron las fusiones *pgaA-cat* en el fondo genético $\Delta ygbI$. Sin embargo no se encontraron cambios de actividad comparando con el fondo silvestre (datos no mostrados), lo cual hace suponer que la relación YgbI-*pgaABCD* se da de forma indirecta.

5.3. Caracterización de la actividad enzimática de los dominios ABD de RcsC.

Una vez que demostramos que los dominios ABD de RcsC poseen la capacidad de regular la transcripción del operón *pga*, procedimos a realizar un análisis funcional más detallado de los mismos. Se tiene el antecedente de que cuando se completa el sistema de fosfotransferencia de RcsCDB (es decir cuando RcsC actúa como cinasa) RcsB activa la transcripción de los genes *cps* y reprime la transcripción de los genes *flh*. Con el objetivo de dilucidar si los dominios ABD de RcsC actúan como cinasa o fosfatasa, se transformaron el vector vacío pMPMT6 Ω o el plásmido pMPMT6ABD (que expresa los dominios ABD) en cepas que contienen fusiones cromosomales de *flhD4* (regulador maestro de la síntesis de flagelo) o *cps* (operón de 19 genes que codifica las proteínas necesarias para la síntesis de ácido colánico) a *lacZ* proporcionadas por Alan Wolfe^[10]. Los ensayos se realizaron en medio líquido LB a 37 °C, utilizando 0.1% de glucosa como represor o arabinosa como inductor de la expresión de RcsC. Las muestras se tomaron 5 horas después de la adición del azúcar y se analizaron para actividad de beta-galactosidasa tal como se describe en materiales y métodos.



Grafica 3. Ensayo de actividad de las fusiones cromosomales *cps* y *flhD4* al gen reportero *lacZ* en los fondos pMPMT6ABD y pMPMT6. El ensayo se realizo a 37 °C y 220 rpm utilizando glucosa al 0.1% como represor o arabinosa al 0.1% como inductor.

Es posible observar en la gráfica 3 que al inducir la producción de los dominios ABD de RcsC clonados en el plásmido pMPMT6ABD, la expresión de la fusión *cps-lacZ* no presenta cambios pero la fusión *flhD4-lacZ* aumenta su actividad al doble. Si los dominios ABD ejercieran actividad de cinasa se esperaría que al sobreexpresar dichos dominios se fosforilara RcsD y que éste, a su vez, transfiriera el fosfato a RcsB, el cual activaría el gen *cps* reprimiendo a *flhD4*. Sin embargo, si los dominios ABD ejercen función de fosfatasa, el circuito de transferencia de fosfato en rcsCDB no se completa ya ni RcsD ni RcsB no son fosforilados, permaneciendo entonces *cps* apagado y *flhD4* encendido. Por tanto, podemos deducir que los dominios ABD de RcsC, bajo las condiciones de crecimiento empleadas al favorecer la formación de biopelícula, presentan actividad de fosfatasa.

5.4. Análisis de los dominios ABD de RcsC en los fondos $\Delta ackA$ y $\Delta ackA \Delta ptA$.

En la búsqueda de un posible regulador de respuesta que relacione a RcsC con el operón *pgaABCD* se consideró nuestra evidencia de que los dominios ABD de RcsC actúan como fosfatasa por lo que la actividad más probable que ejerza sobre el regulador de respuesta sería la remoción de fosfato más no la de fosforilación. Se sabe que existen reguladores de respuesta que pueden ser fosforilados por moléculas que actúan como fosfodonadores (carbamil fosfato, fosforamidato y acetil fosfato)^[18]. Dado que existe evidencia de otros grupos donde se muestra que el acetil fosfato es un importante fosfodonador en algunos reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes, decidimos estudiar más a fondo esta posibilidad. El acetil fosfato es el intermediario reversible de la vía PtA-AckA, la cual interconvierte coenzima A (CoASH), ATP y acetato en acetil coenzima A (Acetil-CoA), ADP y P_i (figura 10). La reversibilidad de esta vía permite tanto la síntesis de Acetil-CoA (activación de acetato) como la evolución de acetato (acetogénesis)^[25]. Por lo anterior, se decidió hacer ensayos de cuantificación de biopelícula induciendo los dominios ABD de RcsC en los fondos $\Delta ackA$ y $\Delta ackA \Delta ptA$, para así evaluar el efecto que origina la acumulación de acetil fosfato en la formación de biopelícula (ver figura 10).

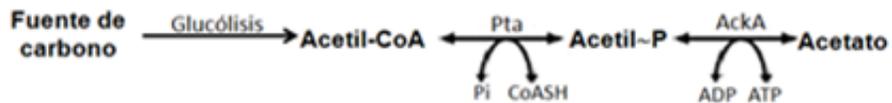
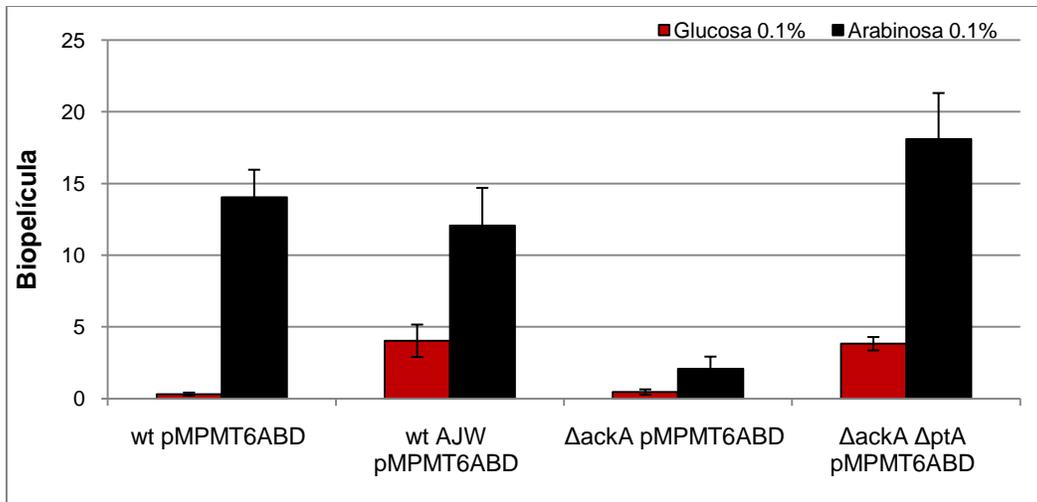


Figura 10. Esquema donde se muestran las reacciones bioquímicas que involucra la vía PtA-AckA, donde el acetil fosfato es un intermediario importante.



Gráfica 4. Ensayo de cuantificación de biopelícula inducida por el plásmido pMPMT6ABD en los fondos $\Delta ackA$ y $\Delta ackA \Delta ptA$ a las 8 horas. El ensayo se realizó a 30 °C utilizando glucosa al 0.1% como represor y arabinosa al 0.1% como inductor.

Nuestros resultados indican que la formación de biopelícula se abate en el fondo $\Delta ackA$ y que el fenotipo se restaura en la mutante $\Delta ackA \Delta ptA$. Lo que nos lleva a la conclusión de que la acumulación de acetil fosfato inhibe la formación de biopelícula. Se sabe que el acetil fosfato puede fosforilar directamente algunos reguladores de respuesta y es posible que en este caso particular fosforile un regulador de respuesta que reprima la expresión del operón *pga* y por consiguiente la formación de biopelícula.

5.5. Ensayo de interacción OmpR-*pgaA*.

Con el resultado de que la acumulación de acetil fosfato veda la formación de biopelícula, surge la idea de que sea éste el que fosforile directamente un regulador de respuesta que actué reprimiendo la expresión del operón *pgaABCD* y que los dominios ABD de RcsC, con su actividad de fosfatasa, desfosforilen dicho regulador para liberar al operón *pgaABCD* de la represión.

Así, buscando en la bibliografía se encontró que OmpR se fosforila en presencia de acetil fosfato el dominio N-terminal de OmpR en el aminoácido Asp55 y la fosforilación induce un cambio conformacional que es transmitido al extremo C-terminal vía el enlazador central^[18]. OmpR desfosforilado se une al DNA pero con

una afinidad de 10 a 30 veces menor que cuando se encuentra fosforilado^[14]. Consideramos a OmpR como uno de los mejores candidatos a ser el posible regulador de respuesta que reprima al operón *pga* y con base en esto se decidió realizar ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), para evaluar si OmpR puede unirse a la región intergénica de *pgaA* y si su estado de fosforilación cambia la especificidad de esta unión. Como control negativo se utilizó la región codificante de *ler* (figura 11).

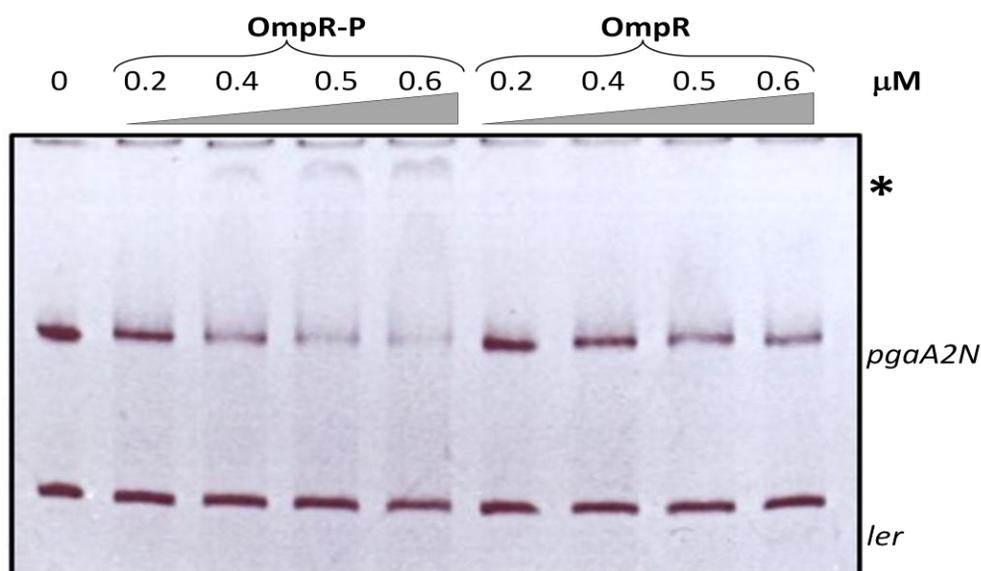


Figura 11. EMSA que demuestra la interacción de OmpR con la región intergénica de *pgaA*. Un fragmento de DNA, que comprende la región reguladora de *pgaA* (-482 a +259), fue incubado con concentraciones crecientes de OmpR-6xHis (0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6 μM) fosforilada directamente con acetil fosfato (OmpR-P) o desfosforilada. El complejo DNA-proteína fue resuelto en un gel de poliacrilamida al 6% y teñido con bromuro de etidio. El fragmento *ler* fue utilizado como control negativo. El * denota el complejo DNA-OmpR formado.

El EMSA muestra claramente que OmpR puede interactuar con la región intergénica de *pgaA* y que la proteína fosforilada se une con mayor afinidad al DNA que la proteína desfosforilada. Para validar el resultado obtenido mediante EMSA será necesario identificar la región exacta donde la proteína se une al DNA mediante ensayos de "footprint", así como el ensayo de las fusiones *pgaA-cat* en el fondo genético $\Delta ompR \Delta pgaC$ y $\Delta ompR \Delta pgaC$ pMPMT6ABD.

5.6. Análisis de la fusión *ygbI-cat*.

Análisis de microarreglos demostraron que la sobreexpresión de RcsC activa la expresión de *ygbI*. Con la finalidad de validar que la expresión de *ygbI* depende de RcsC se decidió analizar la fusión *ygbI-cat* sobreexpresando los dominios ABD de RcsC.

La fusión pKK232ygbI2 abarca toda la región intergénica de *ygbI-J* y parte de la región codificante del gen divergente *ygbJ* (tabla 6, figura 12). Esta fusión se ensayó en el fondo genético $\Delta pgaC$ pMPMT6ABD a 37 °C. Debido a que en ensayos preliminares se observó que la actividad se presenta hasta las 12 horas, la toma de muestras se realizó después de las 12 horas de incubación (gráfica 5).

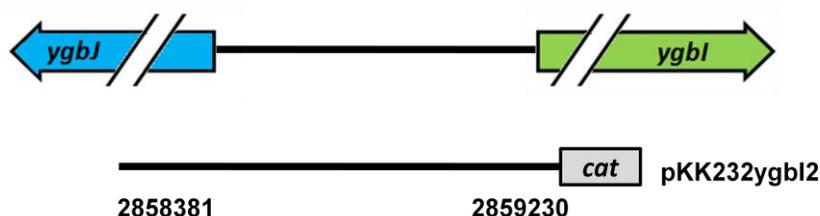
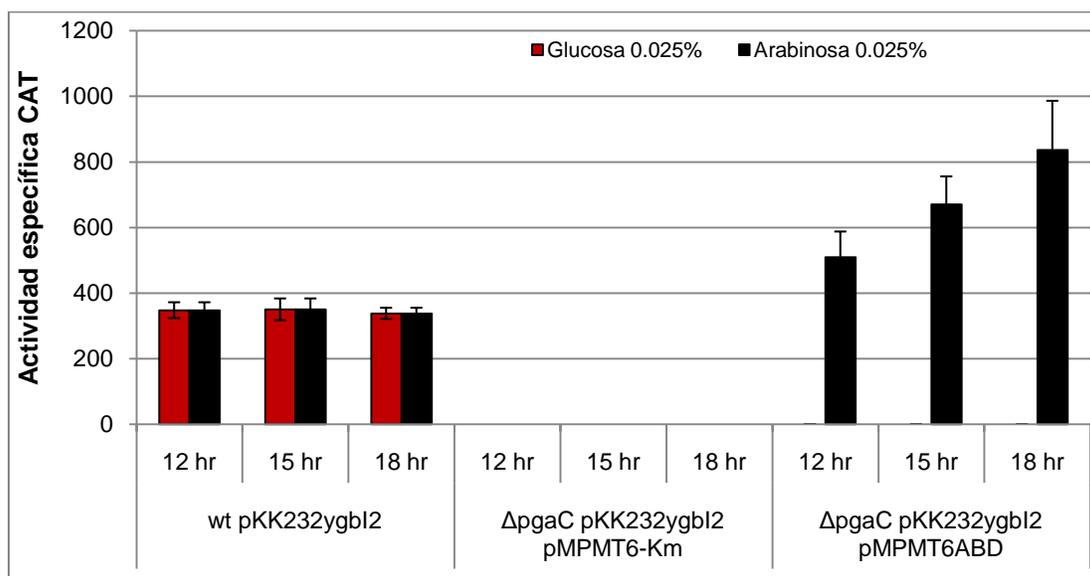


Figura 12. Diagrama que muestra de forma esquematizada la fusión transcripcional de *ygbI-cat*.



Gráfica 5. Ensayo de actividad de la fusión *ygbI* al gen reportero *cat* (pKK232ygbI2) en el fondo genético wt, $\Delta pgaC$ pMPMT6-Km y $\Delta pgaC$ pMPMT6ABD. El ensayo se realizó a 37 °C a 220 rpm utilizando glucosa al 0.025% como represor o arabinosa al 0.025% como inductor. Las muestras fueron tomadas a las 12, 15 y 18 horas de incubación.

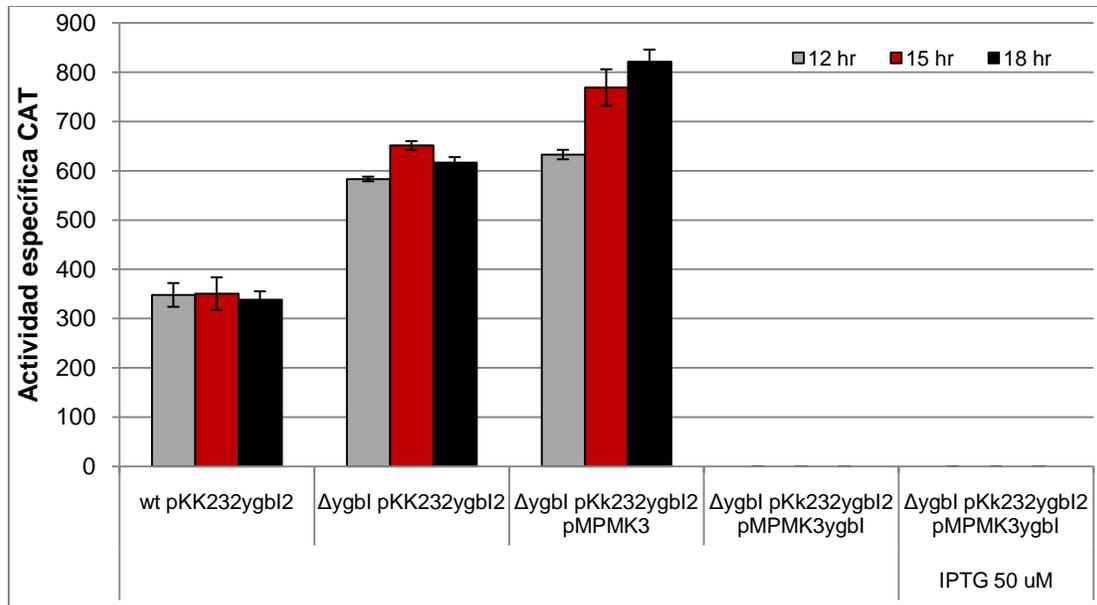
Después de realizar los ensayos y analizando diferentes controles, observamos que el vector pMPMT6 Ω utilizado para expresar los dominios ABD de RcsC, apaga la expresión basal de la fusión *ygbI-cat*. La hipótesis que manejamos fue que el casete que confiere la resistencia a tetraciclina era el responsable del silenciamiento, sin embargo aun cuando se logró cambiar la resistencia del vector vacío pMPMT6 a kanamicina, éste sigue apagando la expresión de la fusión, lo cual indica que es algún otro factor en el plásmido lo que abate la actividad.

La expresión basal de la fusión *ygbI-cat* es detectable desde tiempos cortos (4 horas, DO₆₀₀=0.8), pero cuando contiene el plásmido pMPMT6ABD la expresión se detecta hasta tiempos largos (12 horas, DO₆₀₀=1.5). A pesar del silenciamiento que origina el vector de clonación, se puede observar que cuando inducimos los dominios ABD de RcsC la actividad de la fusión transcripcional aumenta hasta un 100% (a las 18 horas). La deducción anterior coincide y refuerza los resultados obtenidos mediante los microarreglos, donde la expresión de los dominios ABD de RcsC ocasiona que *ygbI* incremente su expresión.

5.7. Ensayo de complementación de *ygbI*.

Con la idea de que Ygbl podría autoregularse, se ensayó la fusión pKK232ygbI2 en el fondo genético $\Delta ygbI$. Si Ygbl se autoregulara negativamente esperaríamos un incremento en la actividad de la fusión transcripcional, en el caso que la regulación fuera positiva la actividad disminuiría.

Observamos que la expresión de la fusión *ygbI-cat* en el fondo $\Delta ygbI$ aumenta en comparación con la expresión basal detectada en el fondo silvestre, lo cual nos indica que Ygbl se autoregula negativamente (gráfica 6). Con este resultado, se decidió realizar el ensayo de complementación transformando el plásmido pMPMK3ygbI, que expresa a Ygbl, para así complementar el fenotipo.



Gráfica 6. Ensayo de actividad de la fusión *ygbI2* al gen reportero *cat* (pKK232ygbI2) en el fondo genético silvestre (wt) y $\Delta ygbI$ complementada con pMPMK3ygbI, el cual expresa YgbI. Como control se utilizó la cepa $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 pMPMK3. El ensayo se realizó a 37 °C a 220 rpm utilizando 50 μ M de IPTG como inductor. Las muestras fueron tomadas a las 12, 15 y 18 horas.

Los resultados nos muestran que la fusión pKK232ygbI2 aumenta su expresión 2 veces en el fondo $\Delta ygbI$ comparado con el fondo silvestre, indicando que YgbI ejerce un control negativo sobre sí mismo. En el ensayo de complementación que sobreexpresa YgbI, la transcripción de escape es suficiente para apagar por completo la expresión de la fusión pKK232ygbI2, confirmando la idea de que YgbI se autoregula negativamente.

5.8. Análisis de la fusión *ygbJ-cat*.

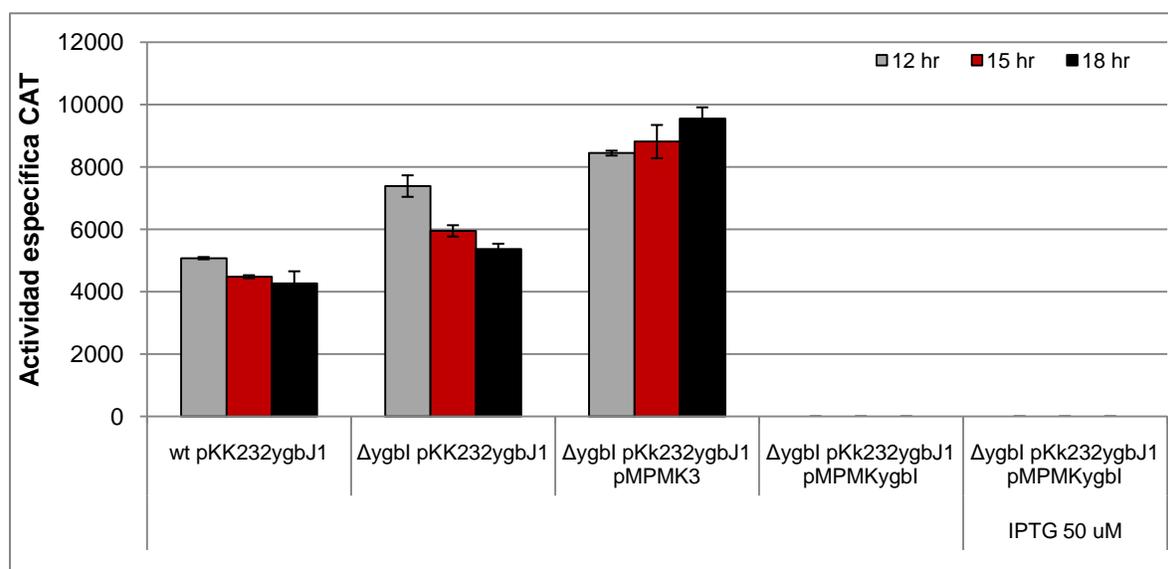
La fusión pKK232ygbJ1 abarca toda la región intergénica de *ygbJ-1* y parte de la región codificante del gen divergente *ygbI* (tabla 6, figura 13).



Figura 13. Diagrama que muestra de forma esquematizada la fusión transcripcional de *ygbJ-cat*.

Para evaluar si Ygbl puede regular a *ygbJ*, se decidió ensayar la fusión contenida en el plásmido pKK232ygbJ1 en el fondo genético $\Delta ygbI$, de tal forma que si Ygbl actuara como represor, la fusión debería aumentar su actividad; en el caso contrario que Ygbl ejerciera función de activador, la actividad de la fusión *ygbJ-cat* disminuiría. Observamos que la expresión de la fusión pKK232ygbJ1 en el fondo $\Delta ygbI$ se incrementa en comparación con la expresión basal en el fondo silvestre, indicándonos que Ygbl reprime la transcripción de *ygbJ* (gráfica 7). Por tanto, también se decidió transformar esta cepa con el plásmido pMPMK3ygbI, que expresa a Ygbl, para así complementar el fenotipo.

La gráfica 7 muestra la actividad basal de la fusión pKK232ygbJ1 en la cepa silvestre y $\Delta ygbI$, así como la cepa complementada con el plásmido pMPMK3ygbI.



Gráfica 7. Ensayo de actividad de la fusión *ygbJ1* al gen reportero *cat* (pKK232ygbJ1) en el fondo genético silvestre (*wt*), $\Delta ygbI$ y $\Delta ygbI$ complementada con pMPMK3ygbI, el cual expresa Ygbl. Como control se utilizó la cepa $\Delta ygbI$ pKK232ygbJ1 pMPMK3. El ensayo se realizó a 37 °C a 220 rpm utilizando 50 μ M de IPTG como inductor. Las muestras fueron tomadas a las 12, 15 y 18 horas.

En la gráfica anterior podemos observar que la expresión de la fusión pKK232ygbJ1 en el fondo $\Delta ygbI$ aumento 50% con respecto a la expresión basal en el fondo silvestre, mostrando que Ygbl reprime la transcripción de *ygbJ*. Al hacer el ensayo de complementación expresando a Ygbl es notorio que la sola transcripción de escape es suficiente para abatir la expresión de *ygbJ*. Por tanto,

los resultados indican que Ygbl regula negativamente la transcripción de *ygbJ*, lo cual se ratifica mediante el ensayo de complementación.

5.9. Sitio de inicio de la transcripción de *ygbI* y *ygbJ*.

Haciendo una revisión bibliográfica, no encontramos reportes que determinaran los sitios de inicio de transcripción de *ygbI* y *ygbJ*; con el objetivo de localizar estos sitios, decidimos realizar ensayos de extensión del iniciador.

El RNA para la reacción de extensión del iniciador se obtuvo de las cepas wt pKK232ygbI2, $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2, $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 pMPMK3 y $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 pMPMK3ygbI después de 12 horas de crecimiento, la última de éstas en presencia de 50 μ M de IPTG (figura 14).

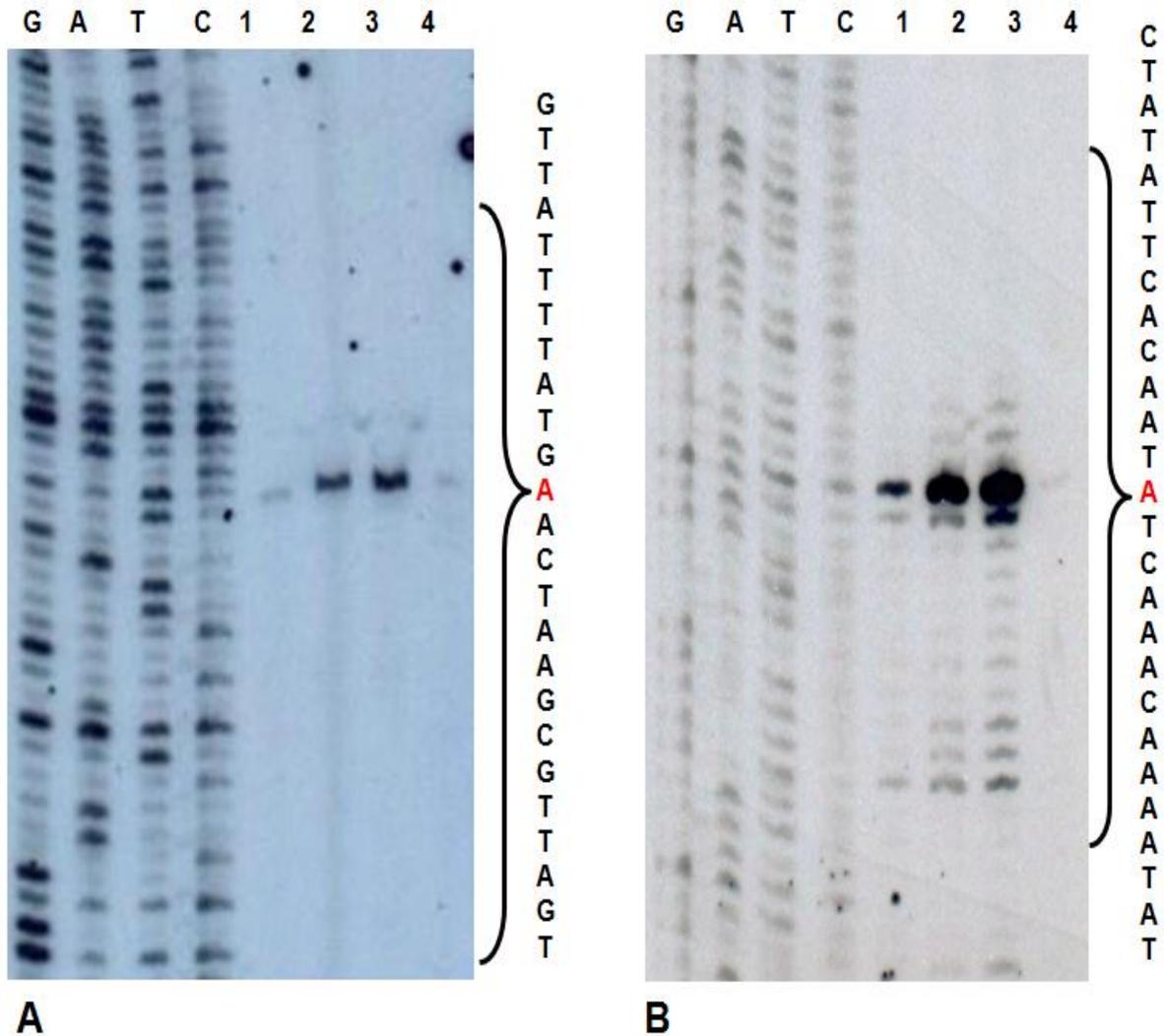


Figura 14. Análisis de extensión del iniciador para *ygbI* (A) y *ygbJ* (B). RNAs utilizados para la reacción de transcriptasa reversa: 1, wt pKK232ygbI2; 2, $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2; 3, $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 pMPMK3; 4, $\Delta ygbI$ pKK232ygbI2 pMPMK3ygbI. En el margen lateral se muestra la secuencia de la cadena de ADN codificante y el primer nucleótido transcrito está indicado en rojo. Los ensayos se realizaron en tres ocasiones.

Mediante este experimento fueron encontrados los sitios de inicio de la transcripción de *ygbI* y *ygbJ*. En ambas figuras observamos que en el fondo $\Delta ygbI$ la señal aumenta en comparación con la detectada en el fondo silvestre y cuando se sobreexpresa YgbI, el transcrito se pierde, esto es una prueba más de que YgbI se autoregula negativamente y actúa como represor sobre *ygbJ*.

5.10. Ensayos de interacción Ygbl-ygbJ o Ygbl-pgaA.

Debido a que una característica de los reguladores transcripcionales de la familia DeoR es la de regular los genes que se transcriben de forma divergente, se realizaron ensayos EMSA para observar si Ygbl puede unirse a la región intergénica de *ygbJ-I* (figura 15). Como control negativo se utilizó la región codificante de *ler*.

Al realizar ensayos de cuantificación de biopelícula expresando los dominios ABD de RcsC en la cepa silvestre y en el fondo genético $\Delta ygbI$, observamos que los niveles de biopelícula se incrementan en el fondo mutante. Este resultado nos abre la posibilidad de que Ygbl pudiera actuar como represor del operón *pgaABCD*. Para evaluar esta idea se efectuaron ensayos EMSA a la región reguladora de *pgaA*. Se utilizó el mismo control negativo, la región codificante de *ler*.

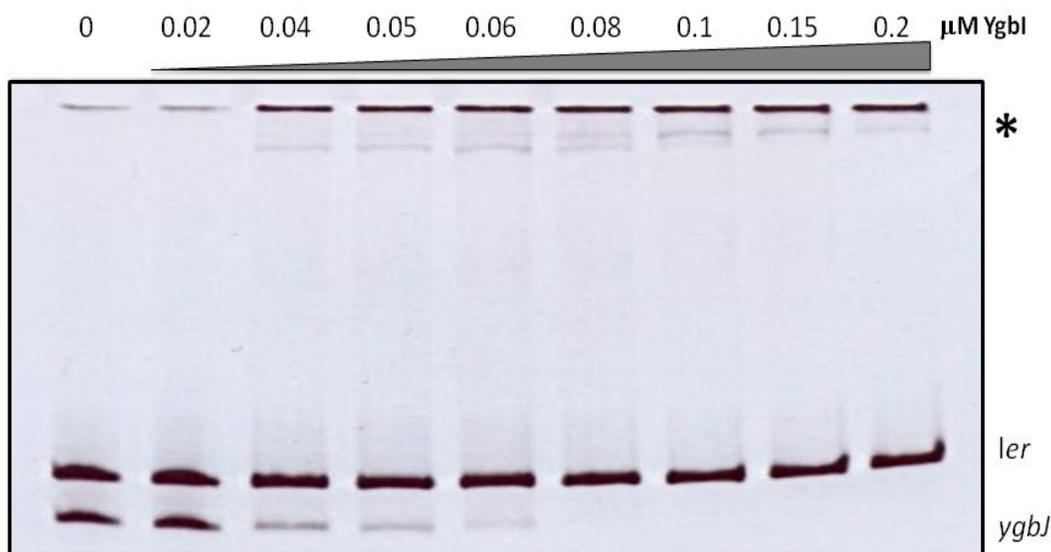
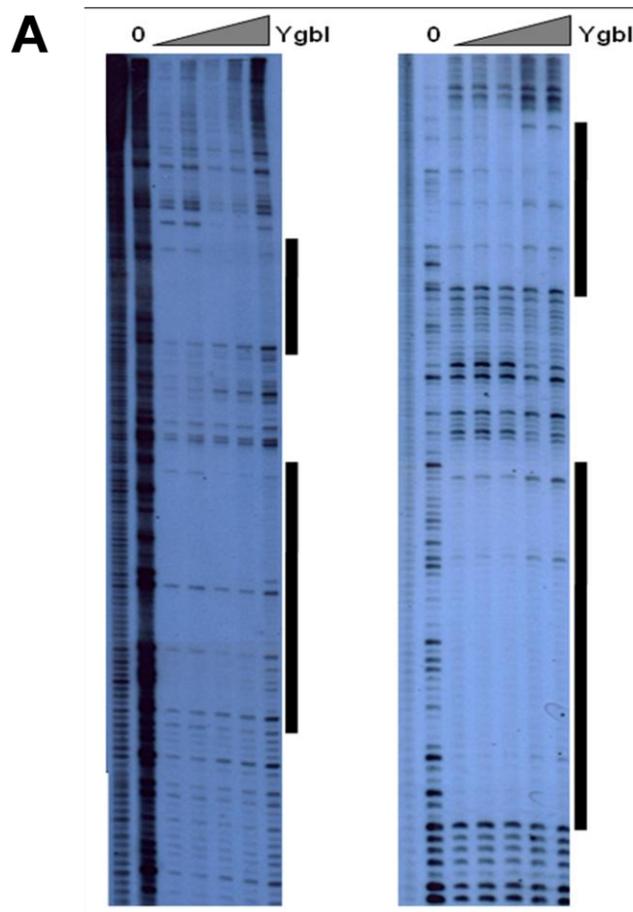


Figura 15. EMSA que demuestra la interacción de Ygbl con la región intergénica de *ygbJ-I*. Un fragmento de DNA, que comprende la región reguladora de *ygbJ* (-118 a +210), fue incubada con concentraciones crecientes de Ygbl-6xHis (0, 0.02, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15 y 0.2 μM). El complejo DNA-proteína fue resuelto en un gel de poliacrilamida al 6% y teñido con bromuro de etidio. El fragmento *ler* fue utilizado como control negativo. El asterisco (*) denota el complejo Ygbl-*ygbJ-I*

El EMSA (figura 15) evidencia claramente que Ygbl interactúa con la región intergénica de *ygbJ-I* formando el complejo de interacción Ygbl-*ygbJ-I* que

difícilmente entra en el gel de poliacrilamida, mientras que *ler* permanece intacto. Para retardar completamente 80 ng de *ygbJ-1* se necesitó Ygbl a 0.08 μ Mol. El mismo ensayo con la región reguladora de *pgaA* (datos no mostrados) no reveló interacción aun cuando se probaron mayores concentraciones de Ygbl (hasta 0.6 μ Mol), esto es una prueba más que descarta la interacción directa de Ygbl con *pgaA*.

Con la intención de profundizar más en la interacción Ygbl-*ygbJ-1*, se realizó un ensayo de DNase-I Footprint para encontrar las secuencias de DNA exactas donde Ygbl se está pegando (figura 16) y así identificar los nucleótidos relevantes que Ygbl reconoce.



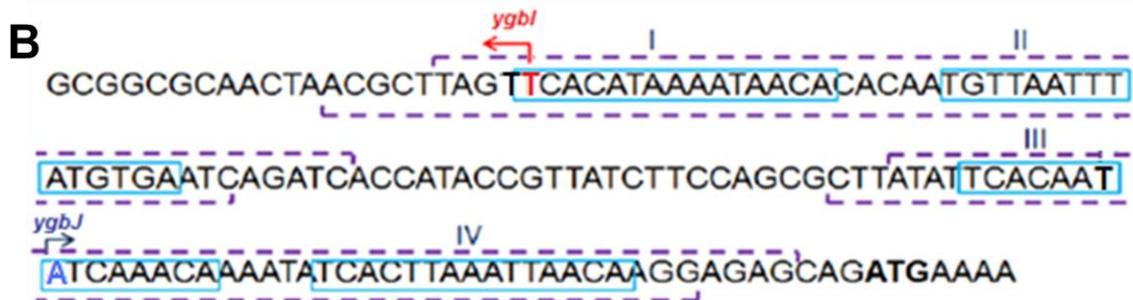


Figura 16. Ensayos de DNase-I footprint de YgbI en la región intergénica *ygbJ-I*. A) Productos de amplificación de 348 pb fueron marcados en su extremo 5' con ^{32}P y sometidos a digestión con DNase-I en presencia de concentraciones crecientes de YgbI. En la cadena positiva (izquierda) y negativa (derecha) se muestran las regiones protegidas, marcadas con líneas verticales adyacentes a las secuencias. B) Secuencia nucleotídica en la que se indica la interacción entre YgbI y *ygbJ-I* evidenciada por experimentos de DNase-I footprint. Las líneas interrumpidas arriba y debajo de la secuencia indican las regiones protegidas por YgbI en la cadena superior e inferior de ADN. Las cajas azules (I-IV) muestran las secuencias repetidas que probablemente actúan como sitios de unión de YgbI. Las flechas roja y azul marcan los sitios de inicio de transcripción de *ygbI* y *ygbJ* respectivamente.

En el esquema anterior se muestran dos zonas protegidas por YgbI en ambas hebras de DNA de la región intergénica de *ygbJ-I*. Dentro de estas regiones se encontraron 4 secuencias palindrómicas que probablemente corresponden a los nucleótidos reconocidos por YgbI, estas cajas consenso pueden ser buscadas en el genoma de *E. coli* para detectar posibles blancos de regulación para YgbI.

5.11. Análisis de las fusiones *ygbJ, K, L, M y N* al gen reportero *cat*.

Con la finalidad de establecer si los genes *ygbJ-N* se transcriben como un operón, ensayamos las fusiones transcripcionales de las regiones intergénicas de cada uno de estos genes y además las fusiones *ygbKL-cat*, *ygbLM-cat* y *ygbMN-cat* en el fondo genético silvestre (tabla 6, figura 17).

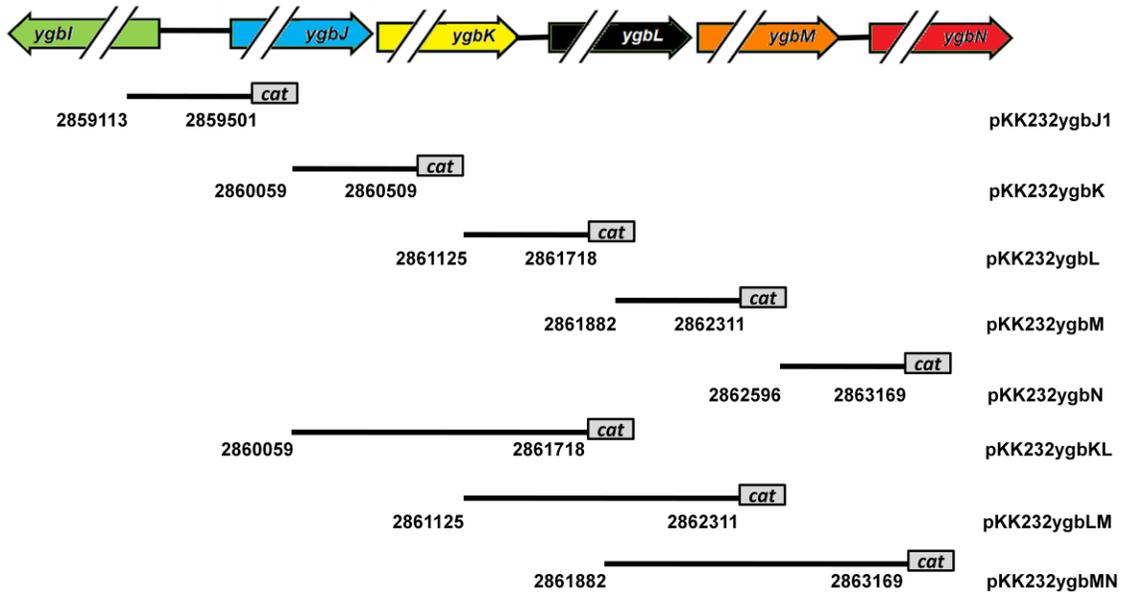
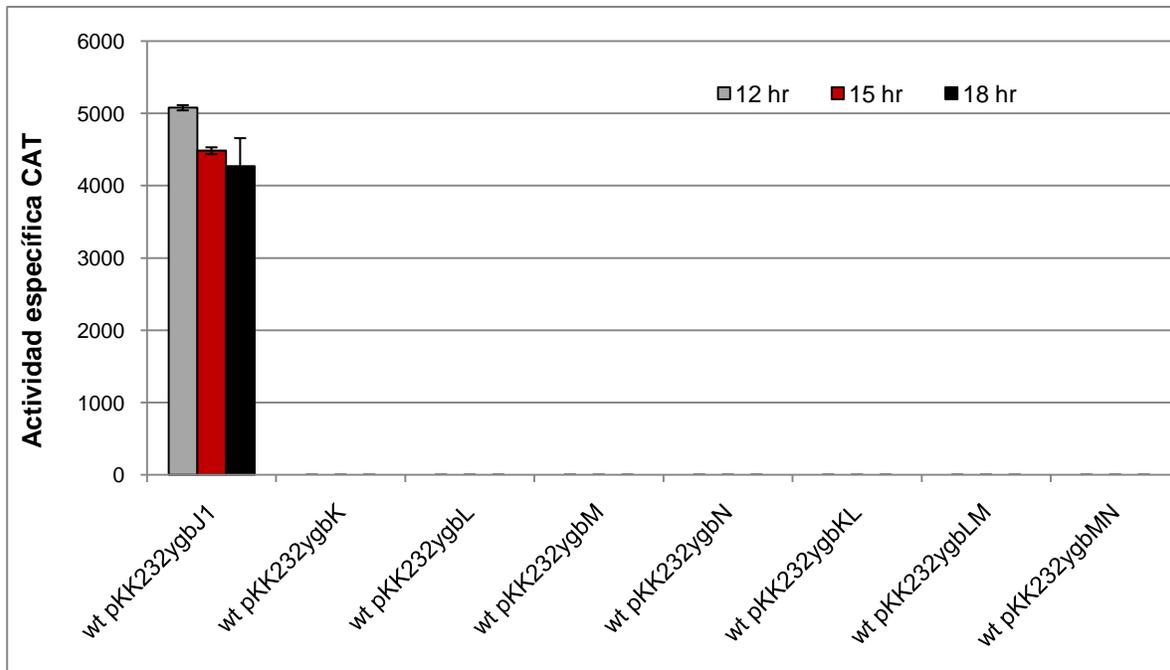


Figura 17. Diagrama que muestra de forma esquematizada las fusiones transcripcionales de las regiones intergénicas de los genes *ygbJ-N*.



Gráfica 8. Ensayo de actividad de las fusiones *ygbJ-N* al gen reportero *cat* en el fondo genético silvestre (wt). El ensayo se realizó a 37 °C a 220 rpm, las muestras fueron tomadas a las 12, 15 y 18 horas.

Los ensayos muestran actividad solo en la fusión *ygbJ-cat*, indicando que probablemente solo se genera un transcrito de J a N a partir de un promotor en la región reguladora de *ygbJ*. Los resultados nos sugieren que los genes *ygbJKLMN* se transcriben como un operón bajo las condiciones de crecimiento ensayadas. Sería conveniente realizar ensayos de RT-PCR que arrojen como resultado la obtención de un solo transcrito y de esta forma reforzar los datos obtenidos mediante las fusiones transcripcionales.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se ha observado que usualmente las bacterias forman comunidades densamente pobladas conocidas como biopelículas, sugiriendo que vivir en grupos es crítico para la evolución y ecología bacterianas. Las biopelículas no son solo un agregado de células, sino que presentan alta complejidad estructural y fisiológica, mismas que requieren cascadas de señalización que constituyan un mecanismo de respuesta. Los sistemas de dos componentes sirven como un sistema básico de estímulo-respuesta que permite a las bacterias detectar las señales y responder a los cambios en diferentes condiciones ambientales. En el presente estudio demostramos que la sobreexpresión de los dominios ABD de la histidín cinasa RcsC, de manera independiente al resto del sistema de fosforilación, activa la expresión del operón *pgaABCD* y consecuentemente origina la formación de biopelícula en *E. coli*. También mostramos que OmpR-P se une de forma específica a la región reguladora de *pgaA* y que la acumulación de acetil fosfato, en el fondo $\Delta ackA$, abate la formación de biopelícula dependiente de la sobreexpresión de RcsC. Aunque no está definido qué estados fisiológicos promueven la acumulación de acetil fosfato se sabe que varía dependiendo de la fuente de carbono utilizada. Podríamos sugerir que si la bacteria crece en un ambiente que no le genere estrés nutricional, donde no necesite formar biopelícula para defenderse de las agresiones externas y no requiera obtener energía mediante la vía PtA-AckA, se genere un incremento en la cantidad de acetil fosfato, el cual puede fosforilar directamente al regulador de respuesta OmpR y este a su vez se uniría a la región intergénica de *pgaA* para regular negativamente la producción de PGA y por consiguiente la formación de biopelícula. Sin embargo, si el ambiente cambia y en *E. coli* surge la necesidad de formar biopelícula, RcsC podría actuar como fosfatasa y desfosforilar a OmpR para liberar al operón *pgaABCD* de la represión transcripcional (figura 18).

En nuestra búsqueda del regulador de respuesta que completara el sistema de señalización de RcsC hacia el operón *pga*, revelamos que la sobreexpresión de RcsC incrementa la expresión de *ygbI* un regulador transcripcional de la familia

DeoR que no es regulado por fosforilación y que la cantidad de biopelícula formada es mayor en el fondo $\Delta ygbI$ comparado con el fondo silvestre. Sin embargo los ensayos EMSA no mostraron interacción directa de Ygbl con la región intergénica de *pgaA*, tampoco la fusión *pgaA-cat* aumentó su expresión en el fondo $\Delta ygbI$. Esto nos hace suponer que el efecto regulador de Ygbl podría ser a nivel postranscripcional, tal vez reprimiendo la expresión de los RNAs no-traducidos CsrB/C o activando la traducción de CsrA. Demostramos que Ygbl regula negativamente al operón *ygbJKLMN*, del cual aun no se conoce su función pero, por la actividad predicha para cada una de las proteínas que codifica, bien puede involucrarse en el metabolismo de algún azúcar (figura 18).

Son necesarios más estudios que ayuden a sustentar y explicar los mecanismos propuestos, también análisis que definan las condiciones in vivo donde se activan estos mecanismos de regulación de formación de biopelícula.

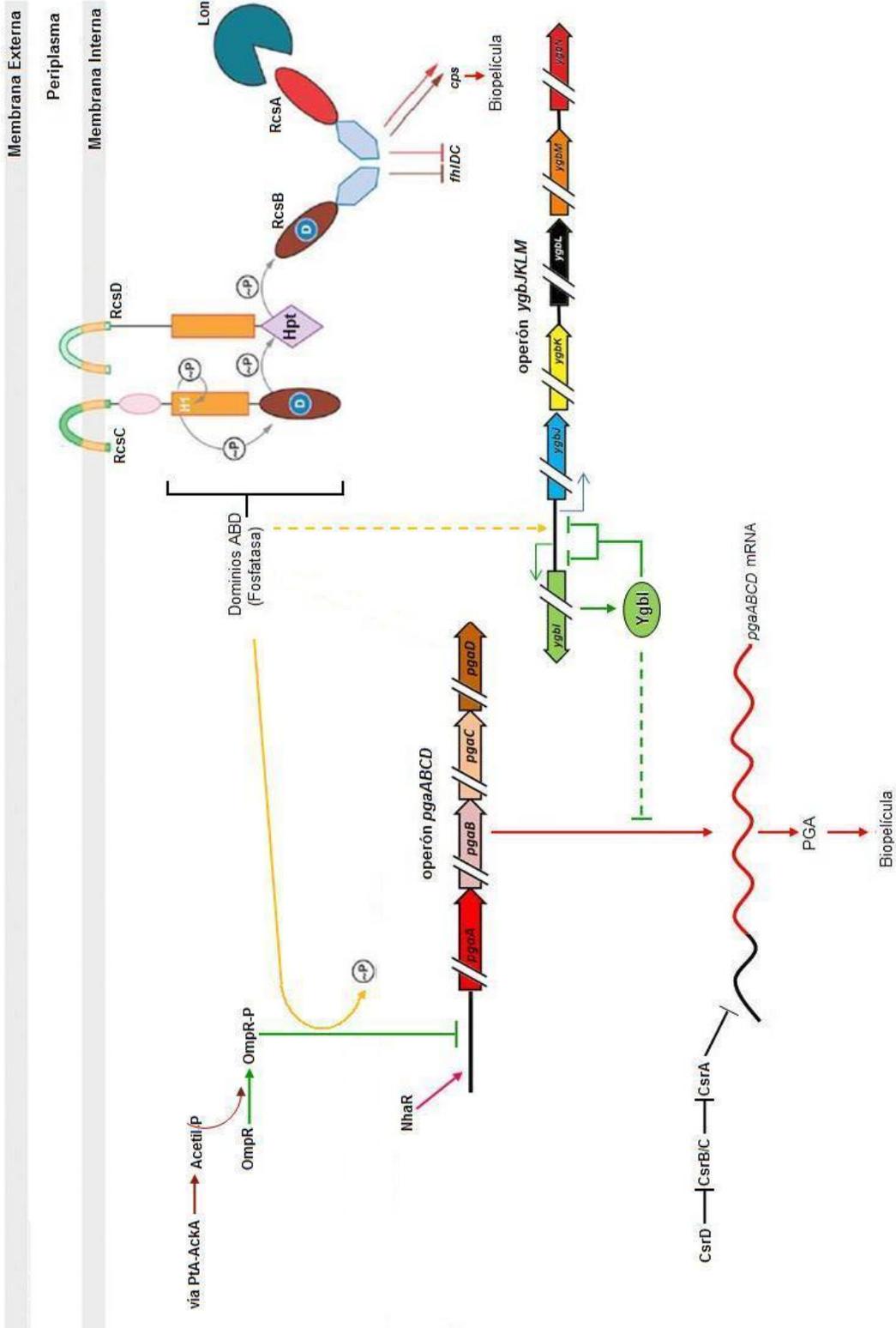


Figura 18. Diagrama final de resultados.

7. CONCLUSIONES

Si se expresan los dominios ABD de RcsC, clonados en el plásmido pMPMT6ABD, las fusiones *pgaA-cat* presentan actividad, indicando que la formación de biopelícula del tipo PGA en este caso es dependiente de RcsC.

La inducción de los dominios ABD de RcsC, clonados en el plásmido pMPMT6ABD, no genera cambios en la actividad de la fusión *cps-lacZ*, pero aumenta al doble la actividad de la fusión *flhD4-lacZ*. Esto nos sugiere que los dominios ABD de RcsC ejercen función de fosfatasa. Dado que el circuito de transferencia de fosfato en RcsCDB no se completa, tanto RcsD como RcsB no son fosforilados por RcsC y por tanto *cps* permanece apagado y *flhD4* continúa encendido.

Se abate la formación de biopelícula en el fondo $\Delta ackA$ pero el fenotipo se restaura en la mutante $\Delta ackA \Delta ptA$, demostrando la importancia de la acumulación de acetil fosfato, el cual puede ser un fosfodoador de un probable regulador de respuesta negativo de la formación de biopelícula, el cual, a su vez puede ser desfosforilado por RcsC.

Demostramos que OmpR interactúa directamente con la región intergénica de *pgaA* y que lo hace con mayor afinidad cuando la proteína se encuentra fosforilada, ya que el fragmento de DNA retarda su corrimiento electroforético a menor concentración de proteína cuando ésta se encuentra fosforilada, formando complejos de interacción *pgaA-OmpR-P*.

La inducción de los dominios ABD de RcsC, clonados en el vector pMPMT6 Ω , origina la expresión de la fusión *ygbI-cat* hasta después de las 12 horas. Claramente se aprecia que cuando inducimos los dominios ABD de RcsC la actividad de la fusión transcripcional aumenta hasta un 100% (a las 18 horas) muy a pesar del ruido de fondo que origina el vector de clonación; lo anterior concuerda con los resultados obtenidos mediante los microarreglos,

Ygbl se autorregula negativamente y actúa como represor sobre *ygbJ* pero no regula directamente al operón *pgaABCD*. Localizamos los sitios de inicio de la transcripción de *ygbI* y de *ygbJ*.

Se encontraron las zonas de protección de Ygbl en la región intergénica de *ygbJ-I* y dentro de éstas, se localizaron 4 secuencias palindrómicas que probablemente corresponden a los nucleótidos reconocidos por Ygbl para unirse al DNA.

Los resultados nos sugieren que los genes *ygbJKLMN* constituyen un operón bajo las condiciones de crecimiento ensayadas, solo la fusión *ygbJ-cat* presenta actividad específica de CAT.

8. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar ensayos de footprinting para determinar la región exacta donde OmpR se une a la región reguladora de *pgaA*, así como ensayar las fusiones *pgaA-cat* en el fondo genético $\Delta ompR \Delta pgaC$ y $\Delta ompR \Delta pgaC$ pMPMT6ABD para validar el resultado obtenido mediante el EMSA.

Se requiere encontrar un vector de clonación para fusionar los dominios ABD de RcsC, el cual no apague las fusiones transcripcionales de *ygbI* y *ygbJ* al gen reportero *cat*, y transformarlo en la cepa $\Delta pgaC$ pKK232ygbI2, para así eliminar el silenciamiento producido por el vector de clonación y encontrar los valores absolutos que genera la expresión de los dominios ABD de RcsC al activar la transcripción de *ygbI*.

Como punto importante, se debe explorar para encontrar la señal que enciende la transcripción de *ygbI*, así como el regulador de respuesta que media la señalización de RcsC hacia *ygbI*.

Es importante complementar los resultados obtenidos mediante fusiones transcripcionales que sugieren que *ygbJKLMN* constituyen un operón realizando ensayos de RT-PCR, que arrojen como resultado la obtención de un solo transcrito.

9. ANEXO.

9.1. Análisis con microarreglos.

	Gen	Función	Intensidad neta 1	Intensidad neta 2
	rscC	Histidin cinasa del sistema de dos componentes RcsCDB	13449.021	14414.455
1	<i>yhcF</i>	Supuesto regulador transcripcional	10305.806	10925.587
2	<i>ygbI</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	9474.7534	10491.645
3	<i>narL</i>	Regulación pleiotrópica de la respiración anaeróbica	9391.0853	10123.492
4	<i>yidP</i>	Supuesto regulador transcripcional	5763.64	6115.3757
5	<i>cheB</i>	Regulador de quimiotaxis	3832.7613	4146.0049
6	<i>yeeY</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	3961.7186	3882.1949
7	<i>ybhD</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	3935.2701	3561.2027
8	<i>atoC</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es AtoS, interactúa con sigma 54	3094.2395	3401.763
9	<i>yjcT</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	2671.4753	3013.7338
10	<i>yhcS</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	2656.7637	2855.263
11	<i>baeR</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es BaeS	2331.9037	2728.8645
12	<i>yefR</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	2460.3	2450.7253
13	<i>yeiE</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	1906.7257	2120.249
14	<i>yjiE</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	1900.2272	2113.4824
15	<i>yjaE</i>	Supuesto regulador transcripcional	2142.5809	2100.4794
16	<i>ompR</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es EnvZ	2012.4463	2084.9449
17	<i>yjcX</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LacI	1727.5186	2014.8302
18	<i>ylcA</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	1635.552	1788.8446
19	<i>yahB</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	1739.2321	1707.6365
20	<i>phnF</i>	Supuesto regulador transcripcional	1268.8233	1481.6333
21	<i>b2381</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	1141.2904	1453.7672
22	<i>hypF</i>	Regulador transcripcional	1326.4162	1441.5593
23	<i>ycjW</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LacI	1235.3679	1406.5348
24	<i>yajF</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	908.17745	1237.9478
25	<i>b1439</i>	Supuesto regulador transcripcional	1260.1721	1221.0708
26	<i>yhfR</i>	Supuesto regulador transcripcional	1089.1934	1170.7824
27	<i>ygiP</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	999.89927	1077.7189
28	<i>yhjC</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	864.59363	1056.3071
29	<i>b1770</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	969.38358	1021.9164
30	<i>araC</i>	Regulador transcripcional del operón <i>ara</i>	928.58848	945.7402
31	<i>yhcK</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia FadA	780.21569	859.80784
32	<i>yeaT</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	806.80637	845.14289
33	<i>agaR</i>	Regulador transcripcional del operón <i>aga</i>	776.9223	764.08873

34	<i>phoP</i>	Regulador transcripcional de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es PhoQ	728.50637	734.28186
35	<i>ycfX</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	785.98407	726.14412
36	<i>ttK</i>	Supuesto regulador transcripcional	663.93015	707.44853
37	<i>yfhA</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	649.12819	688.15049
38	<i>torR</i>	Regulador transcripcional de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es TorS	628.90515	681.50172
39	<i>yehV</i>	Supuesto regulador transcripcional	705.86299	639.99927
40	<i>ygaA</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	664.48799	630.46005
41	<i>b0846</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	570.83235	623.44608
42	<i>ygaE</i>	Supuesto regulador transcripcional	589.27598	614.0424
43	<i>ybbS</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	568.5098	602.70686
44	<i>yjdG</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	447.45539	558.27696
45	<i>b3694</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia FadA	567.54485	556.61226
46	<i>yjfQ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	592.22157	541.09608
47	<i>b1516</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia Lacl	539.22181	531.95907
48	<i>ytfQ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia Lacl	603.75392	525.98775
49	<i>yphH</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	420.01103	496.69706
50	<i>yfiE</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	494.775	488.23358
51	<i>yagP</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	441.31054	472.49093
52	<i>sgcR</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	463.79093	468.15931
53	<i>perR</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	482.76029	465.7473
54	<i>b1422</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	439.00858	460.59387
55	<i>ygeK</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	473.2348	441.19363
56	<i>rcsB</i>	Regulador positivo de la síntesis de ácido colánico	436.23897	431.00074
57	<i>mlc</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	406.6402	429.81373
58	<i>ygeW</i>	Supuesto regulador transcripcional	311.18529	425.49387
59	<i>ycjZ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	410.01128	425.40294
60	<i>cheR</i>	Regulador de la quimiotaxis, pertenece a la familia de dos componentes	377.05662	413.02647
61	<i>pdhR</i>	Regulador transcripcional del complejo piruvato deshidrogenasa	392.44436	396.48799
62	<i>yihW</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	287.69878	390.00049
63	<i>lldR</i>	Supuesto regulador transcripcional	403.19387	383.7973
64	<i>yihL</i>	Supuesto regulador transcripcional	330.99534	375.13922
65	<i>b0845</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	313.57157	373.74191
66	<i>yhdM</i>	Supuesto regulador transcripcional	309.26299	324.40049
67	<i>bglJ</i>	Regulador transcripcional de sistema de dos componentes	236.85147	321.43162
68	<i>yhcl</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia NagC	312.16348	306.34093
69	<i>yfnL</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	282.4598	301.19436
70	<i>envR</i>	Supuesto regulador transcripcional	297.27427	298.20956
71	<i>cbl</i>	Regulador transcripcional del regulón <i>cys</i>	286.30784	296.64779
72	<i>phoB</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos	238.67892	295.31275

		componentes, su histidin cinasa es PhoB		
73	<i>celD</i>	Regulador transcripcional negativo del operón <i>cel</i>	308.11226	293.17966
74	<i>irhA</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR	283.80098	287.2223
75	<i>ygiX</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	306.06544	284.08235
76	<i>ybdO</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	344.91324	281.54265
77	<i>ybbI</i>	Supuesto regulador transcripcional	223.74951	280.09191
78	<i>ydhB</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	304.4875	274.58162
79	<i>arcA</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es ArcB	309.72672	272.12059
80	<i>yhaJ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	220.89828	268.22083
81	<i>b1284</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia DeoR	244.98995	266.33946
82	<i>ygfl</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	196.05074	258.86005
83	<i>yeiL</i>	Supuesto regulador transcripcional	271.36863	258.56544
84	<i>ptsP</i>	Regulador transcripcional del sistema PTS	158.25098	247.73652
85	<i>glnG</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es GlnL, interactúa con sigma 54	250.80343	237.91593
86	<i>crl</i>	Regulador transcripcional del gen críptico <i>csgA</i>	196.66029	232.85809
87	<i>ybiH</i>	Supuesto regulador transcripcional	203.78407	231.27476
88	<i>csgD</i>	Supuesto regulador transcripcional del segundo operón del curli	264.71716	225.43407
89	<i>ybeF</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	168.25588	219.80858
90	<i>ydF</i>	Supuesto regulador transcripcional	208.26985	217.93628
91	<i>ybaO</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia Lrp	262.53946	203.26912
92	<i>ycgE</i>	Supuesto regulador transcripcional	240.82304	196.79485
93	<i>nadR</i>	Probable regulador transcripcional de <i>nadAB</i>	215.16103	194.42843
94	<i>basR</i>	Regulador transcripcional de sistema de dos componentes, su histidin cinasa es BasS	239.15564	193.56716
95	<i>ycaN</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	228.58333	192.20392
96	<i>ygeV</i>	Supuesto regulador transcripcional	185.63456	191.19706
97	<i>idnR</i>	Regulador transcripcional del L-idonato	181.87721	184.2152
98	<i>farR</i>	Regulador transcripcional del operón de la succinil CoA sintetasa	118.7625	179.15637
99	<i>mhpR</i>	Regulador transcripcional del operón <i>mhp</i>	214.24951	176.29289
100	<i>yafC</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	149.93677	168.7826
101	<i>uvrY</i>	Regulador transcripcional de sistema de dos componentes, su histidin cinasa es BarA	115.02647	166.60613
102	<i>yiaU</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	149.61887	161.1799
103	<i>narP</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa NarL	209.8	151.48946
104	<i>ydZ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	101.56642	137.80441
105	<i>yedW</i>	Supuesto regulador transcripcional de sistema de dos componentes	121.78039	136.61177
106	<i>ydeW</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia SorC	158.06471	132.69755
107	<i>yneJ</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	117.97941	129.34878
108	<i>dniR</i>	Regulador transcripcional para la nitrito reductasa	143.99779	126.1598
109	<i>cysB</i>	Regulador transcripcional positivo del regulón de	115.3125	116.42427

		cisteína		
110	<i>ydaK</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LysR	98.460294	114.19804
111	<i>cpxR</i>	Regulador transcripcional en sistema de dos componentes, su histidin cinasa es CpxA	76.529657	110.64216
112	<i>sdiA</i>	Regulador transcripcional del cluster <i>ftsQAZ</i>	143.06446	107.49216
113	<i>yphF</i>	Supuesto regulador transcripcional de la familia LacI	130.53995	105.75662
114	<i>caiF</i>	Regulador transcripcional del operón <i>cai</i>	117.73015	105.10196
115	<i>yggD</i>	Supuesto regulador transcripcional	84.268873	104.99216
116	<i>uhpA</i>	Regulador de respuesta de la familia de dos componentes, su histidin cinasa es UhpB	116.66765	98.660539
117	<i>creB</i>	Regulación catabólica	131.02843	97.047304
118	<i>slyA</i>	Regulador transcripcional de hemolisina criptica	113.43971	72.495833
119	<i>hydG</i>	Regulador de respuesta de la familia de los dos componentes, su histidin cinasa es HydH	45.962745	63.082598

10.REFERENCIAS

1. Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A. and Gilbert P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167: 179-184.
2. Amouyal M., Mortensen L., Buc H. and Hammer K. 1989. Single and double loop formation when *deoR* repressor binds to its natural operator sites. *Cell.* 58: 545-551.
3. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita A.M., Wanner B.L. and Mori H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol.* 1744: 4292-4306
4. Babitzke P. 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol.* 189: 5472-5481.
5. Baker C.S., Morozov I., Suzuki K., Romeo T. and Babitzke P. 2002. CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 44: 1599-1610.
6. Bijlsma J. and Groisman E.A. 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* 11: 359-366.
7. Carballes F., Bertrand C., Bouche J.P., and Cam K. 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system RcsC-RcsB. *Mol Microbiol.* 34: 442-450.
8. Davey M.E. and O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol.* 64: 847-867.
9. Elgrably-Weiss M., Schlosser-Silverman E., Rosenshine I. and Altuvia S. 2005. DeoT, a DeoR-type transcriptional regulator of multiple target genes. *FEMS Microbiol Lett.* 254: 141-148.
10. Fredericks C.E., Shibata S., Aizawa S., Reimann S.A. and Wolfe A.J. 2006. Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay. *Mol Microbiol.* 61: 734-747
11. Garces F., Fernández F.J., Gómez A.M., Pérez-Luque R., Campos E., Prohens R., Aguilar J., Baldoma L., Coll M., Badía J. and Vega C. 2008. Quaternary structural transitions in the DeoR-Type Repressor UlaR control transcriptional readout from the L-ascorbate utilization regulon in *Escherichia coli*. *Biochem.* 47: 11424-11433.
12. Goller C., Wang X., Itoh Y. and Romeo T. 2006. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol.* 188: 8022-8032.

13. Gudapaty S., Suzuki K., Wang X., Babitzke P. and Romeo T. 2001. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 6017-6027.
14. Head C.G., Tardy A. and Kenney L.J. 1998. Relative binding affinities of OmpR-phosphate at the *ompF* and *ompC* regulatory sites. *J Mol Biol.* 281 (5): 857-870.
15. Itoh Y., Rice J.D., Goller C., Pannuri A., Taylor J., Meisner J., Beveridge T.J., Preston J.F. 3rd and Romeo T. 2008. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol.* 190: 3670-3680.
16. Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J. W., Hart M. E. and Romeo T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184: 290-301.
17. Keener J. and Kustu S. 1988. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc Nat Acad Sci USA.* 85:4976-4980.
18. Kenney L.J. Bauer M.D. and Silhavy T.J. 1995. Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (19):8866-8870.
19. Laub M. T. and Goulian M. 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet.* 41: 121-145.
20. Lee S.F., Li Y.H. and Bowden G.H. 1996. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun.* 64:1035-38.
21. Liu M.Y., Yang H. and Romeo T. 1995. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* 177: 2663-2672.
22. Lois A. F., Weinstein M., Ditta G. S. and Helinski D. R. 1993. Autophosphorylation and phosphatase activities of the oxygen-sensing protein FixL of *Rhizobium meliloti* are coordinately regulated by oxygen. *J Biol Chem.* 268:4370-4375.
23. Mack D., Fisher W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., and Laufs R. 1996. The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *staphylococcus epidermidis* is a linear B-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178: 175-183.
24. Majdalani N. and Gottesman S. 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol.* 59: 379-405.
25. Mizrahi I., Biran D. and Ron Z. E. 2009. Involvement of the Pta-ackA pathway in protein folding and aggregation. *Res Microbiol.* 160: 80-84.
26. Mizuno T. 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducer in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 4: 161-168.

27. O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 54: 49-79.
28. Pérez-Rueda E., Collado-Vides J. and Segovia L. 2004. Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea. *Computational Biology and Chemistry.* 28: 341-350.
29. Podar M. 2007. Two-component systems in microbial communities: approaches and resources for generating and analyzing metagenomic data sets. *Methods Enzymol.* 422: 32-46.
30. Romeo T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* 29: 1321-1330.
31. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. and Vabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 40: 175-179.
32. Stock A.M., Robinson V.L. and Goudreau P.N. 2000. Two-Component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69: 183-215.
33. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G. and Costerton J.W. 2002. Biofilms as a complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56: 187-209.
34. Stout V., Torres-Cabassa A., Maurizi M.R., Gutnick D., and Gottesman S. 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J Bacteriol.* 173:1738-1747.
35. Suzuki K., Babitzke P., Kushner S. R. and Romeo T. 2006. Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev.* 20: 2605-2617.
36. Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Pernestig A., Melefors Ö., Georgellis D., Babitzke P. and Romeo T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184: 5130-5140.
37. Tsuzuki M., Ishige K. and Mizuno T. 1995. Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: in vitro studies with mutants. *Mol Microbiol.* 18: 953-962.
38. Van Houndt R. and Michaelis C.W. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 156: 626-633.
39. Wang X., Dubey A.K., Suzuki K., Baker C.S., Babitzke P. and Romeo T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 56 (6): 1648-1663.
40. Wang X., Preston III J.F., and Romeo T. 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesion required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186: 2724-2734.

41. Wehland M. and Bernhard F. 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem.* 275: 7013-7020.
42. Wei B.L., Brun-Zinkernagel A.M., Simecka J.W., Pruss B.M., Babitzke P. and Romeo T. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 40: 245–256.