



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de la mutante PilR<sub>D53N</sub> del sistema de dos componentes PilS-PilR en *Geobacter sulfurreducens*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

**Presenta:**

Xadeni Burgos Gamez

**Tutor principal**

Dra. Katy Juárez López  
Instituto de Biotecnología

**Miembros del comité tutor**

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos CCG, UNAM  
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán IBT, UNAM



Cuernavaca, Mor. Julio, 2018



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.

## TABLA DE CONTENIDO

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	3
III.	MARCO TEÓRICO.....	4
1.	El género <i>Geobacter</i> .....	4
2.	Microorganismo modelo: <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	4
3.	Citocromos tipo <i>c</i> identificados como relevantes en la reducción de Fe(III) .....	6
4.	Pili tipo IV de <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	7
5.	Sistemas de dos componentes .....	10
6.	Regulación transcripcional del pili tipo IV .....	13
6.1	Regulación de la expresión de <i>pilA</i> en <i>G. sulfurreducens</i> .....	14
IV.	ANTECEDENTES .....	17
V.	JUSTIFICACIÓN .....	21
VI.	HIPÓTESIS .....	21
VII.	OBJETIVOS .....	21
1.	Objetivo general: .....	21
2.	Objetivos específicos: .....	21
VIII.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
IX.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
1.	Cepas bacterianas .....	23
2.	Plásmidos .....	23
3.	Oligos .....	24
4.	Medios de cultivo.....	25
5.	Condiciones de cultivo .....	25
6.	Complementación de la mutante deficiente en PilR de <i>G. sulfurreducens</i> .....	26
6.1	Extracción de DNA plasmídico .....	26
6.2	Construcción del plásmido pKJPilR <sub>D53N</sub> .....	26
6.3	Electroforesis de ácidos nucleicos .....	26
6.4	Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	26
6.5	Ligación de fragmentos de DNA .....	26
6.6	Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....	26
6.7	Preparación de células electrocompetentes de <i>G. sulfurreducens</i> .....	27
7.	Caracterización de la mutante PilR <sub>D53N</sub> en <i>G. sulfurreducens</i> .....	28
7.1	Comprobación de la adecuada expresión y actividad de PilR <sub>D53N</sub> .....	28
7.1.1	Extracción de proteínas .....	28
7.1.2	Electroforesis de proteínas .....	28
7.1.3	Purificación de la proteína PilR .....	28
7.1.4	Purificación de anticuerpos vs PilR por inmunoblot.....	29
7.1.5	Inmunoblot para las proteínas PilA y PilR.....	29
7.1.6	Análisis de la expresión de la fusión transcripcional <i>pilA::luxCDABE</i> por PilR y PilR <sub>D53N</sub> .....	30
7.2	Reducción de aceptores de electrones solubles.....	30
7.2.1	Curvas de crecimiento en medio NBAF .....	30
7.2.2	Ensayos de reducción de Fe(III) .....	30

7.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones .....	31
7.3.1 Extracción de RNA.....	31
7.3.2 Extracción de DNA genómico .....	31
7.3.3 Tratamiento de RNA con DNasa I .....	31
7.3.4 Síntesis de cDNA .....	31
7.3.5 Análisis de la expresión de genes por qPCR.....	32
7.4 Caracterización del biofilm .....	32
7.4.1 Medición del biofilm por cristal violeta .....	32
7.4.2 Análisis de producción y estructura del biofilm por microscopía confocal.....	33
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
1. Complementación de la mutante deficiente en PilR de <i>G. sulfurreducens</i> .....	34
2. Caracterización de la mutante PilR <sub>D53N</sub> en <i>G. sulfurreducens</i> .....	36
2.1 Comprobación de la adecuada expresión y actividad de PilR <sub>D53N</sub> .....	36
2.2 Evaluación de la producción de PilA o pilina.....	38
2.3 Reducción de aceptores de electrones solubles.....	39
2.4 Análisis de la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones .....	42
2.5 Caracterización del biofilm de <i>G. sulfurreducens</i> .....	45
X. CONCLUSIONES .....	54
XI. PERSPECTIVAS .....	55
XII. ANEXOS .....	56
XIII. BIBLIOGRAFÍA .....	58

## Índice de figuras

Figura 1. Morfología de <i>Geobacter sulfurreducens</i> .....	5
Figura 2. Modelo propuesto del mecanismo de transferencia extracelular de electrones en <i>G. sulfurreducens</i> .....	7
Figura 3. Estructura de la pilina tipo IVa.....	9
Figura 4. Estructura del pili de <i>G. sulfurreducens</i> .....	10
Figura 5. Mecanismo de regulación de los sistemas de dos componentes .....	11
Figura 6. Dominios funcionales de las proteínas HK y RR.....	12
Figura 7. Modelo del ensamble del pili y función de las isoformas de PilA.....	15
Figura 8. Contexto genético de las proteínas PilS-PilR en <i>G. sulfurreducens</i> .....	15
Figura 9. Dominios estructurales de las proteínas PilS-PilR de <i>G. sulfurreducens</i> ....	17
Figura 10. Ensayos de autofosforilación y fosfotransferencia <i>in vitro</i> de las proteínas PilS-PilR.....	18
Figura 11. Expresión de la fusión <i>PpilA::luxCDABE</i> por PilR y PilR <sub>D53N</sub> .....	18
Figura 12. Genes diferencialmente expresados en la mutante PilR- de <i>G. sulfurreducens</i> .....	19
Figura 13. Mecanismo de regulación de la expresión de <i>pilA</i> por el TCS PilS-PilR en <i>G. sulfurreducens</i> .....	20
Figura 14. Estructura de los plásmidos pBADPilR <sub>D53N</sub> y pKJPilR.....	34
Figura 15. Plásmido pKJPilR <sub>D53N</sub> .....	35
Figura 16. Aislamiento de clonas de <i>G. sulfurreducens</i> .....	35
Figura 17. Evaluación del efecto de las proteínas PilR y PilRD53N sobre la activación de la fusión transcripcional <i>PpilA::luxCDABE</i> .....	36
Figura 18. Inmunodetección de PilR.....	37
Figura 19. Inmunodetección de PilA.....	38
Figura 20. Curvas de crecimiento en medio NBAF.....	40
Figura 21. Análisis de la reducción de Fe(III) soluble.....	41
Figura 22. Caracterización del biofilm por cristal violeta .....	46
Figura 23. Imágenes de microscopia confocal a 36 horas de cultivo.....	48
Figura 24. Imágenes de microscopia confocal a 60 horas de cultivo.....	48
Figura 25. Vista lateral del biofilm a 36 horas de cultivo.....	49
Figura 26. Vista lateral del biofilm a 60 horas de cultivo.....	49

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas.....	23
Tabla 2. Plásmidos utilizados.....	23
Tabla 3. Oligos.....	24
Tabla 4. Factor de cambio en la cantidad de pilina producida .....	38
Tabla 5. Expresión diferencial de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones.....	43
Tabla 6. Viabilidad de las células que constituyen el biofilm.....	50
Tabla 7. Características del biofilm formado por las diferentes cepas de <i>G.</i> <i>sulfurreducens</i> .....	51

## I. RESUMEN

*Geobacter sulfurreducens* es una bacteria del subsuelo que es capaz de acoplar la respiración anaeróbica a la reducción de diferentes aceptores externos, incluyendo metales. Esta característica le permite tener diferentes aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación de sitios contaminados con compuestos orgánicos y metales y la generación de electricidad a partir de la oxidación de compuestos orgánicos acoplada a la transferencia de electrones a electrodos, constituyendo una fuente alternativa de energía renovable (Bond y Lovley, 2003; Lovley, 1997; Rotaru *et al.*, 2015). El pili tipo IV de *G. sulfurreducens* es esencial para llevar a cabo todos estos procesos, es conductivo y por tanto actúa como un nanocable (Reguera *et al.*, 2005).

La biogénesis del pili en *G. sulfurreducens* involucra diversos genes, entre estos *pilA*, que codifica para la proteína estructural del pili o pilina. La regulación de la expresión de *pilA* depende principalmente del factor  $\sigma^{54}$  y el sistema de dos componentes PilS-PilR. Donde PilS es la proteína histidina cinasa y PilR es la proteína reguladora de respuesta y una proteína tipo EBP (Enhancer Binding Protein). Se sabe que PilR regula de manera directa la expresión de *pilA* y que la mutación D53N en PilR, la cual genera una proteína PilR que no puede fosforilarse, favorece la expresión de *pilA* (Hernández *et al.*, 2017). Estos estudios se realizaron expresando los componentes en un sistema heterólogo y por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la proteína PilR no fosforilable (PilR<sub>D53N</sub>) en *G. sulfurreducens*. Para ello se complementó la mutante deficiente en PilR (Juárez *et al.*, 2009) con el plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub>, el cual expresa la variante no fosforilable de PilR.

Los resultados obtenidos comprueban que la variante no fosforilable de PilR favorece la expresión de *pilA* en *G. sulfurreducens*. Además de evaluar el efecto de PilR<sub>D53N</sub> en la expresión de *pilA*, se estudiaron los cambios en la reducción de aceptores de electrones, en el proceso de formación de biofilm y en la expresión de algunos citocromos importantes en la transferencia de electrones. En primer lugar, no se observaron grandes cambios en el crecimiento en medio NBAF el cual tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor. Sin embargo, si se observan cambios importantes en medio citrato férrico, el cual tiene acetato como donador de electrones y Fe(III) soluble como aceptor. En este medio de cultivo, la cepa PilR- fue incapaz de reducir Fe(III) soluble y esta característica se restaura cuando se complementa la cepa PilR- con pKJPilR y cuando se complementa con pKJPilR<sub>D53N</sub> la capacidad de reducir Fe(III) es incluso mayor que en la cepa WT. En cuanto a la formación de biofilm, la cepa PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> genera el biofilm con mayor grosor, mejor homogeneidad y mejor cobertura de sustrato y esto puede deberse a que esta cepa sobre expresa *pilA* y GSU1501, genes que están involucrados en el proceso de formación de biofilm.

Finalmente, observamos que la variante no fosforilable de PilR o PilR<sub>D53N</sub> genera una sobre expresión de *omcS* el cual codifica para un citocromo importante en el proceso de transferencia de electrones. Con estos resultados podemos concluir que una variante no fosforilable de PilR (PilR<sub>D53N</sub>) no sólo favorece la expresión de *pilA*, sino también la expresión de otros genes importantes en el proceso de transferencia de electrones y formación de biofilm. Por tanto, esta cepa podría ser más eficiente para transferir electrones a electrodos en una celda de combustible microbiana.

## II. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Geobacter* son los organismos más abundantes en suelos y sedimentos donde la reducción de Fe(III) y Mn(IV) es un proceso importante. Estos microorganismos tienen un metabolismo anaeróbico y utilizan como aceptores finales de electrones diferentes metales, llevando a cabo una respiración disimilatoria de los mismos. Como fuente de carbono y como donador de electrones utilizan principalmente acetato, el cual es un compuesto abundante en los suelos y sedimentos donde se encuentran estos microorganismos. Además, tienen la capacidad de utilizar otros compuestos orgánicos como alcoholes, ácidos orgánicos, entre otros (Lovley, 2006, 2011; Shi *et al.*, 2016). Debido a las características peculiares de estos microorganismos, se han propuesto diversas aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos o metales pesados, la producción de electricidad en celdas microbianas de combustible, etc (Shi *et al.*, 2016). Un ejemplo de este tipo de aplicaciones fue la biorremediación de un sitio contaminado con uranio en Rifle, Colorado donde se realizó un proceso de bioestimulación *in situ* con acetato para favorecer el crecimiento de las especies de *Geobacter* nativas y con ello un aumento en la reducción de uranio. La reducción de U(VI) a U(IV) disminuye la solubilidad de este metal y por lo tanto su biodisponibilidad (Anderson *et al.*, 2003).

La característica fisiológica que le permite a las Geobacterias llevar a cabo estas aplicaciones, es el proceso de transferencia extracelular de electrones característico de estos microorganismos (Lovley, 2008; White *et al.*, 2016). El principal modelo de estudio para evaluar este proceso es *Geobacter sulfurreducens*, el cual utiliza proteínas tipo redox como los citocromos tipo *c* y el pili tipo IV, el cual tiene características conductivas, para transferir extracelularmente los electrones generados de su metabolismo a diferentes aceptores externos (Reguera *et al.*, 2005, 2006). Por lo tanto, es importante evaluar la regulación transcripcional de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la transferencia de electrones para poder favorecer este proceso y con ello las aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos.

La regulación transcripcional del gen que codifica para PilA o pilina, que es la proteína estructural del pili tipo IV de *G. sulfurreducens* es una de las más estudiadas. Se sabe que en el proceso de regulación participan varios reguladores. El principal es el sistema de dos componentes (TCS) PilS-PilR, pero otros reguladores como Flp1, Flp2 y las subunidades de IHF también participan (Hernández *et al.*, 2016, 2017). Para que un TCS active la expresión de sus genes blanco se requiere la forma fosforilada del regulador. Sin embargo, en el TCS PilS-PilR de *G. sulfurreducens* ya se ha observado que es la forma no fosforilada de PilR la que activa la expresión de PilA, al menos en un sistema heterólogo (Hernández *et al.*, 2017). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de una variante no fosforilable de PilR en *G. sulfurreducens*.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 1. El género *Geobacter*

*Geobacter* pertenece a la familia *Geobacteraceae*, que a su vez pertenece al dominio Bacteria, phylum *Proteobacteria*, clase *Deltaproteobacteria* y orden *Desulfuromonadales*. Estos microorganismos son bacilos Gram negativos, mesófilos, anaeróbicos y no fermentativos cuya característica principal es la reducción disimilatoria de una gran gama de óxidos metálicos. Las Geobacterias son muy abundantes en suelos y sedimentos donde la reducción de Fe(III) y Mn(IV) son procesos importantes y por lo tanto juegan un papel relevante en los ciclos biogeoquímicos de estos metales (Holmes *et al.*, 2004).

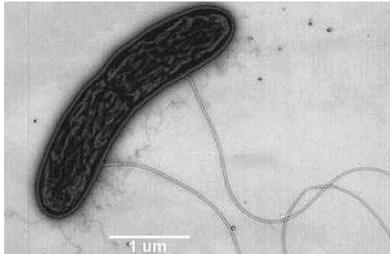
Las especies de *Geobacter* son fisiológicamente versátiles, tienen la capacidad de metabolizar diferentes compuestos orgánicos hasta CO<sub>2</sub>. Todas pueden oxidar acetato y utilizar ácidos orgánicos pequeños como propionato y alcoholes como butanol y etanol como fuente de carbono. Inclusive, algunas especies pueden oxidar compuestos aromáticos como tolueno y benceno (Lovley, 1997). Además de reducir Fe(III), pueden utilizar otros aceptores de electrones como U(VI), Tc(VII), Co(III) y sustancias húmicas y pueden transferir los electrones generados de su metabolismo a electrodos e incluso a otros microorganismos (Shi *et al.*, 2016). Estas características fisiológicas de las especies de *Geobacter* le permiten tener diversas aplicaciones biotecnológicas; entre ellas, la biorremediación de sitios contaminados con materia orgánica, petróleo o metales tóxicos, la obtención de energía en celdas microbianas de combustible (MFC) y en procesos de *biomining* (Lovley, 2006, 2011; Shi *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior se han hecho diversos estudios y se han secuenciado varios genomas de las especies de *Geobacter* para entender la fisiología y ecología de estos microorganismos y de ese modo poder potenciar sus aplicaciones biotecnológicas. Las especies de este género más estudiadas son *Geobacter metallireducens*, que fue la primera especie en ser descrita (Lovley *et al.*, 1993) y *Geobacter sulfurreducens*, que es el modelo de estudio en este trabajo (Caccavo *et al.*, 1994).

#### 2. Microorganismo modelo: *Geobacter sulfurreducens*

*G. sulfurreducens* es una delta proteobacteria perteneciente a la familia *Geobacteraceae* que fue originalmente aislado de sedimentos contaminados con petróleo (figura 1) (Caccavo *et al.*, 1994). Este microorganismo es el principal modelo para estudiar la fisiología de las especies de la familia *Geobacteraceae* debido a que es un organismo cultivable, su genoma ya ha sido secuenciado (Methé *et al.*, 2003) y

existen herramientas para su manipulación genética (Chan *et al.*, 2015; Coppi *et al.*, 2001). Este microorganismo puede utilizar todos los aceptores de electrones extracelulares comunes a las especies de *Geobacter* y tiene la ventaja de que puede crecer con un aceptor de electrones alternativo, fumarato (Caccavo *et al.*, 1994).



**Figura 1. Morfología de *Geobacter sulfurreducens*.** Es un bacilo Gram negativo que habita en el subsuelo y presenta metabolismo anaerobio. En la imagen se pueden observar los flagelos y los pilis que presenta este microorganismo. Tomada de <http://blogs.nature.com>

La secuenciación del genoma de *G. sulfurreducens* y los estudios genéticos y electroquímicos realizados hasta la fecha han revelado muchas características fisiológicas no conocidas de esta bacteria. En primer lugar, debido a que este microorganismo debe cambiar su metabolismo en respuesta a cambios en su ambiente, el genoma de *G. sulfurreducens* codifica una alta proporción de proteínas involucradas en detectar cambios en su ambiente y en respuesta, regular la expresión de algunos genes. Posee un gran número de sistemas de dos componentes (TCS), codifica para 90 histidina cinasas (HK), 93 reguladores de respuesta (RR) de los cuales 28 son proteínas reguladoras tipo EBP (Enhancer Binding Protein) y los factores sigma RpoD, RpoS, RpoH, RpoN, RpoE y FliA (Methé *et al.*, 2003). Además, codifica para más de 100 citocromos tipo *c*, la abundancia de este tipo de proteínas resalta la importancia del proceso de transferencia extracelular de electrones en este microorganismo y sugiere la posible redundancia de las vías involucradas en este proceso y la diversidad de aceptores de electrones que puede utilizar.

El proceso de transferencia extracelular de electrones se puede definir como el proceso en el cual los electrones derivados de la oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a la superficie externa de la célula para reducir un aceptor de electrones extracelular (Lovley, 2008; White *et al.*, 2016). En general, existen dos mecanismos para la transferencia extracelular de electrones:

- **Transferencia mediada por transportadores de electrones:** donde una molécula orgánica o inorgánica, producida por el microorganismo o exógena, funciona como un mediador redox, el cual es un compuesto que puede entrar en la célula, aceptar electrones generados del metabolismo, salir de la célula en un estado reducido y entonces donar los electrones a los diferentes aceptores.

- **Transferencia directa de electrones:** en la cual se establece un contacto directo entre la célula bacteriana y el aceptor de electrones, puede ser mediado por proteínas redox de membrana (citocromos tipo c) o pili bacterianos (nanocables bacterianos).

*Geobacter sulfurreducens* utiliza un mecanismo de transferencia extracelular de electrones directo que involucra la participación del pili y numerosos citocromos tipo c (Santos *et al.*, 2015; White *et al.*, 2016). Este proceso de transferencia de electrones ha sido más estudiado utilizando Fe(III), tanto soluble como insoluble, como aceptor final de electrones.

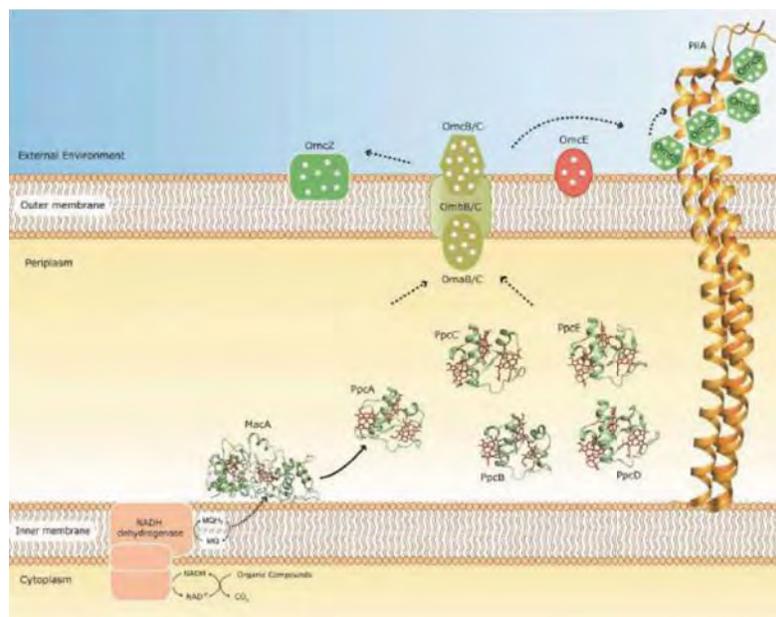
### 3. Citocromos tipo c identificados como relevantes en la reducción de Fe(III)

A pesar de que la reducción de Fe(III) insoluble es una característica ubicua de las especies de *Geobacter*, la mayoría de los citocromos requeridos para la reducción de este metal no están conservados entre las diferentes especies. Se sabe que la reducción de Fe(III) se lleva a cabo en la superficie externa de la célula y estudios han demostrado que el mecanismo por el cual las especies de *Geobacter* reducen óxidos de Fe(III) es diferente del mecanismo en otros microorganismos bien estudiados como *Shewanella* y *Geothrix* (Santos *et al.*, 2015; White *et al.*, 2016). Estas especies utilizan mediadores redox o *shuttles* los cuales promueven la transferencia indirecta de electrones de la superficie celular a los óxidos de Fe(III) (Nevin y Lovley, 2002). Mientras que las especies de *Geobacter* necesitan hacer contacto directo con los óxidos de Fe(III) para poder reducirlos (Mehta *et al.*, 2005; Snoeyenbos-West *et al.*, 2000). *Geobacter* debe construir una cadena de proteínas redox que permita el transporte de electrones desde la membrana interna hasta la superficie externa de la célula, estas proteínas son principalmente citocromos tipo c (Santos *et al.*, 2015; White *et al.*, 2016)

En *G. sulfurreducens* ya se han identificado diversos citocromos que son indispensables para la reducción de Fe(III) (Figura 2). Estos incluyen a MacA, PpcA, OmcB, OmcE y OmcS. Estos citocromos se encuentran en diferentes compartimentos celulares: MacA se localiza en la membrana interna, PpcA en el periplasma, OmcB y OmcE en la membrana externa y OmcS que está completamente expuesto en la superficie externa de la célula, se encuentra asociado con el pili de *G. sulfurreducens* (Butler *et al.*, 2004; Leang *et al.*, 2003; Leang *et al.*, 2010; Lloyd *et al.*, 2003). Además de diferir en su localización celular, estos citocromos tienen otras características diferentes, poseen un número distinto de grupos hemo que varía desde dos en el caso de MacA hasta 12 en OmcB. La diferencia en el número de grupos hemo les confiere diversos potenciales de reducción que favorece el transporte de electrones. Asimismo, difieren en si son esenciales o no para la reducción de Fe(III) soluble e insoluble y en su participación en la reducción de otros aceptores de electrones. Hasta ahora se sabe que PpcA y

homólogos de este citocromo son un punto importante en el proceso de transferencia extracelular de electrones no solo a Fe(III) sino también a otros aceptores como U(VI) y AQDS (Antraquinona-2,6-disulfonato). La delección de MacA afecta la reducción de Fe(III) soluble porque afecta los niveles de expresión de *omcB* el cual es esencial para la reducción de Fe(III) soluble e insoluble. OmcS es esencial para la reducción de Fe(III) insoluble, óxidos de Mn(IV) y sustancias húmicas (Kim y Lovley, 2008; Leang *et al.*, 2003; Lloyd *et al.*, 2003; Mehta *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2015; White *et al.*, 2016).

Además de los citocromos que están involucrados en la reducción de Fe(III), hay otros citocromos que han sido estudiados por ser importantes en el proceso de transferencia extracelular de electrones a otros aceptores externos. Tal es el caso de OmcZ, el cual es un citocromo tipo *c* que se localiza en la matriz extracelular, tiene un tamaño de 30 kDa y 8 grupos hemo. OmcZ es absolutamente necesario para la transferencia extracelular de electrones a electrodos con la consecuente generación de electricidad (Inoue *et al.*, 2010; Reguera *et al.*, 2005).



**Figura 2. Modelo propuesto del mecanismo de transferencia extracelular de electrones en *G. sulfurreducens*.** Los electrones generados de la oxidación de compuestos orgánicos son transferidos a través de una red de citocromos desde la membrana interna hasta la superficie externa. En la reducción de Fe(III) participan los citocromos representados en la imagen a excepción de OmcZ, el cual es indispensable para la transferencia de electrones a electrodos. Modificada de Santos *et al.*, 2015.

#### 4. Pili tipo IV de *Geobacter sulfurreducens*

Además de los citocromos tipo *c*, el pili es otro elemento importante en la transferencia extracelular de electrones, principalmente para la reducción de sustratos insolubles como óxidos metálicos. Antes de describir las características del pili de *G.*

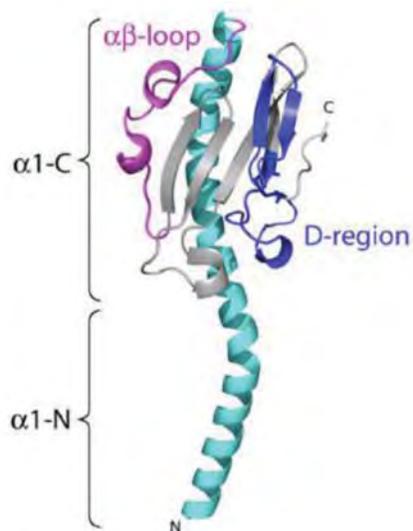
*sulfurreducens*, se hará una descripción de las características generales de este tipo de filamentos y se resaltarán las diferencias del pili de *Geobacter* que probablemente son las responsables de su capacidad conductiva.

El pili de *G. sulfurreducens* es un pili tipo IV, los cuales son filamentos delgados localizados en la superficie de muchas bacterias. Participan en una amplia gama de funciones incluyendo adhesión, motilidad, secreción de proteasas y factores de colonización, sensibilidad a fagos, virulencia, formación de cuerpos fructíferos, formación de biofilm, entre otros (Craig *et al.*, 2004; Craig y Li, 2008). El pili tipo IV está ampliamente distribuido entre las  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -proteobacterias y cianobacterias, a pesar de esta diversidad existe un núcleo de proteínas conservadas que conforman la estructura principal del pili y participan en la biogénesis y ensamble del mismo. Estas proteínas forman un complejo que se localiza en la membrana externa e interna de bacterias Gram negativas y son la pilina o PilA que es el componente estructural principal, una proteasa anclada a la membrana PilD, dos ATPasas (PilB y PilT) que son necesarias para la extensión y retracción del pili respectivamente, PilC, PilM, PilN, PilO y PilP que facilitan el ensamble y la función de la secretina y la secretina PilQ. Aunque ya se han identificado otras proteínas auxiliares menos conservadas que son necesarias para el óptimo ensamble y funcionamiento del pili tipo IV (Burrows, 2012; Nudleman y Kaiser, 2004).

Las pilinas se clasifican en dos subgrupos tipo IVa y tipo IVb, la pilina de *Geobacter* pertenece al IVa. Estas pilinas se encuentran en una variedad de bacterias con amplio rango de hospedero como *Pseudomonas*, *Neisseria* y *Dichelobacter*, las cuales son patógenos de plantas, animales y humanos; así como en microorganismos ambientales como *Myxococcus*, *Deinococcus* y *Shewanella*. Las diferencias entre las pilinas IVa y IVb se encuentran en su longitud y secuencia de aminoácidos. Las pilinas tipo IVa tienen un péptido señal más corto (5 – 6 aminoácidos) que las pilinas tipo IVb (15 – 30 aminoácidos) y una secuencia madura más corta, aproximadamente 150 aminoácidos comparado con 190 aminoácidos para las pilinas tipo IVb (Craig *et al.*, 2004; Giltner *et al.*, 2012; Nudleman y Kaiser, 2004).

Las características estructurales de las pilinas tipo IVa se han estudiado en bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Myxococcus xanthus*, *Neisseria gonorrhoeae*, entre otras. Las pilinas descritas hasta la fecha tienen un tamaño aproximado de 150 aminoácidos, comparten una región conservada de aproximadamente 60 aminoácidos en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal es altamente variable (Craig y Li, 2008). La estructura de las pilinas tipo IVa está caracterizada por una  $\alpha$ -hélice en el extremo N-terminal conectada a un dominio globular formado por laminas  $\beta$  en el extremo C-terminal. La  $\alpha$ -hélice en el extremo N-terminal se divide en dos subdominios:  $\alpha$ 1-N y  $\alpha$ 1-C. El primer subdominio comprende de 1 a 28 aminoácidos, es una región hidrofóbica y es multifuncional; actúa como un segmento transmembrana, como un dominio de

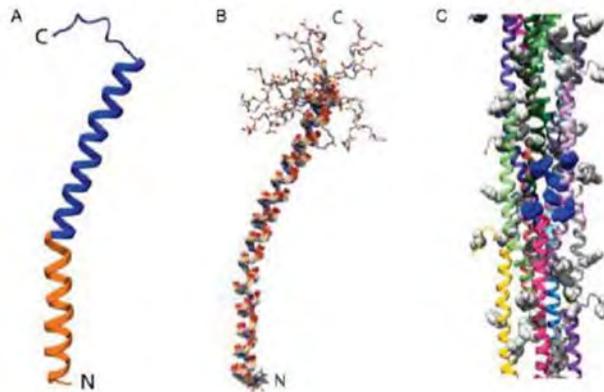
interacción proteína-proteína y como un probable dominio regulador. Por otra parte, el subdominio  $\alpha$ 1-C abarca del aminoácido 29 al 52, es una región anfipática que se encuentra rodeada por las láminas  $\beta$  del extremo C-terminal. La variabilidad en la estructura de las pilinas se encuentra principalmente en tres regiones: en el loop que conecta la  $\alpha$ -hélice del extremo N-terminal al resto de la proteína (loop  $\alpha\beta$ ), los loops entre las cadenas  $\beta$  del extremo C-terminal y la región variable D, en la cual es característico la presencia de dos cisteínas conservadas que forman un enlace disulfuro. (Figura 3) (Craig *et al.*, 2004; Giltner *et al.*, 2012). Otra de las características estructurales de las pilinas tipo IV es su habilidad para ensamblarse reversiblemente en fibras poliméricas las cuales son estabilizadas por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre cada proteína PilA que conforma la fibra (Craig y Li, 2008).



**Figura 3. Estructura de la pilina tipo IVa.** Se muestra la estructura de la pilina de *N. gonorrhoeae*, en la que se resaltan las características principales. En azul cielo la  $\alpha$ -hélice del extremo N-terminal, en rosa el loop  $\alpha\beta$ , en gris las láminas  $\beta$  del extremo C-terminal y en azul marino la región D (Modificada de Giltner *et al.*, 2012).

La estructura del pili de *G. sulfurreducens* difiere de las características estructurales ya mencionadas para el subgrupo IVa. Una de las principales diferencias de la pilina de *Geobacter* es su longitud, es más corta que la mayoría de las pilinas descritas hasta la fecha, tiene solamente 61 aminoácidos y esta diferencia en la longitud genera diferencias en la organización estructural que podrían contribuir a la conductividad del pili. Ya se ha reportado una estructura de la pilina de *G. sulfurreducens* por Resonancia Magnética Nuclear (MNR) (Reardon y Mueller, 2013). La estructura obtenida es mayoritariamente  $\alpha$ -hélice de los residuos 1 al 52 y el resto de la proteína es altamente dinámico. Los subdominios  $\alpha$ 1-N y  $\alpha$ 1-C característicos de las pilinas tipo IVa, están presentes en la pilina de *Geobacter* (Figura 4A). Sin embargo, el subdominio  $\alpha$ 1-C no está estabilizado por el dominio globular del extremo C-terminal, lo que favorece la dinámica observada en el extremo C-terminal de la pilina (Figura 4B). A partir de esta estructura y el modelo de la fibra del pili tipo IV de *N. gonorrhoeae*, se propuso un modelo de la fibra del pili tipo IV de *G. sulfurreducens* el cual tiene un grosor de 3.5 a 4 nm y en

el que se observa que los aminoácidos aromáticos de subunidades de pilina vecinas están agrupados (Figura 4C). Lo que permite una interacción entre la fenilalanina 2 del extremo N-terminal, la fenilalanina 24, la tirosina 27 y 32 del centro de la proteína y la fenilalanina 51 y la tirosina 57 del extremo C-terminal. Se ha sugerido que la conductividad del pili de *G. sulfurreducens* se debe a la transferencia de electrones a través de los aminoácidos aromáticos de la pilina. Por lo tanto, la agrupación de aminoácidos aromáticos en el modelo del pili de *Geobacter* favorece el mecanismo propuesto para la transferencia de electrones (Reardon y Mueller, 2013; Vargas *et al.*, 2013). La conductividad del pili de *G. sulfurreducens* es una conductividad tipo metálica, la cual puede ser atribuida al solapamiento de orbitales pi de los aminoácidos aromáticos (Malvankar *et al.*, 2011).

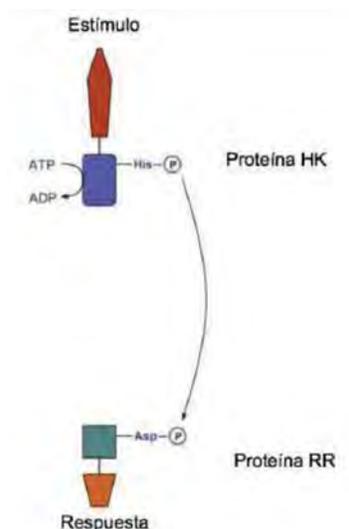


**Figura 4. Estructura del pili de *G. sulfurreducens*.** A. Estructura de la proteína PilA de *G. sulfurreducens* obtenida por NMR, los aminoácidos del 1 al 22, altamente conservados se muestran en naranja y el resto de la proteína en azul. B. Empalme de 18 estructuras de PilA que muestran la dinámica observada en el extremo C-terminal. C. Modelo de la fibra del pili tipo IV de *Geobacter* basado en el modelo del pili tipo IV de *N. gonorrhoeae* en el que se resaltan las interacciones de los aminoácidos aromáticos de subunidades vecinas en color azul (Modificada de Reardon y Mueller, 2013).

## 5. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCS) son el mecanismo predominante para la transducción de señales en bacterias por el cual detectan y responden a señales extracelulares principalmente mediante la regulación de la expresión genética. Los TCS consisten de dos proteínas: una proteína detectora de la señal histidina cinasa (HK) y una proteína reguladora de respuesta (RR) que efectúa una función específica en respuesta al estímulo recibido (Gao y Stock, 2009; Mitrophanov y Groisman, 2008). Estas proteínas de señalización se han encontrado en casi todos los genomas secuenciados de bacterias y se ha observado que responden a un amplio rango de señales y factores de estrés (Capra y Laub, 2012). El mecanismo de regulación propuesto para los sistemas de dos componentes es el siguiente: bajo un estímulo

específico la proteína HK detecta la señal y se autofosforila en un residuo de histidina conservado, este grupo fosfato es después transferido a un residuo de aspartato en la proteína RR contenido en el dominio receptor. La fosforilación de la proteína RR usualmente induce un cambio conformacional que activa el regulador (Figura 5) (Capra y Laub, 2012; Gao y Stock, 2009; Mitrophanov y Groisman, 2008). En la mayoría de los casos, las proteínas histidina cinasas son bifuncionales; por lo que, cuando no están fosforilando a su regulador de respuesta cognado, están actuando como fosfatasa del mismo regulador. Por lo tanto, la cinética de la actividad cinasa y fosfatasa de la proteína HK es la responsable de modular la respuesta ante el estímulo recibido (Jin y Inouye, 1993). Se ha observado que moléculas pequeñas de alta energía como el acetil fosfato, carbamoil fosfato, imidazol fosfato y fosforamidato pueden funcionar como fosfodonadores para las proteínas RR, lo que demuestra que las proteínas RR pueden catalizar su propia fosforilación independientemente de la presencia de su HK cognada (Gao y Stock, 2009; Lukat *et al.*, 1991; McCleary *et al.*, 1993).

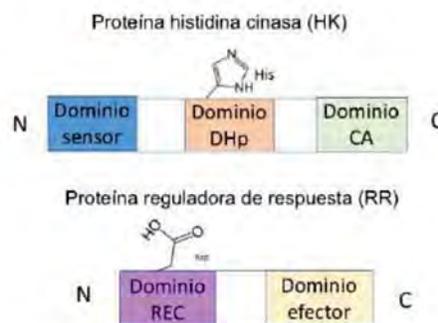


**Figura 5. Mecanismo de regulación de los sistemas de dos componentes.** Las proteínas histidina cinasas (HK) son proteínas de membrana, ante un estímulo específico se autofosforilan en un residuo de histidina conservado. Este grupo fosfato es después transferido a una proteína reguladora de respuesta (RR) en un residuo de ácido aspártico conservado. La fosforilación de la proteína RR induce un cambio de conformación que genera una respuesta (Modificada de Mitrophanov y Groisman, 2008).

Las proteínas histidina cinasas son una amplia familia de proteínas de señalización capaces de catalizar la fosforilación de residuos de histidina a partir de ATP. La mayoría de las proteínas HK tienen dos regiones diferenciadas: una región N-terminal sensora y una región C-terminal catalítica. La región N-terminal presenta un dominio sensor altamente variable, estos dominios pueden ser periplasmáticos, citoplasmáticos o transmembranales. La región C-terminal se encuentra en el citoplasma y tiene los dominios catalíticos para la autofosforilación y fosfotransferencia. Comprende dos dominios altamente conservados y diferenciados estructuralmente: el dominio de dimerización (dominio DHp) que contiene el residuo de histidina conservado importante por ser el sitio de fosforilación y el dominio catalítico y de unión a ATP (dominio CA), también conocido como dominio HATPasa (Figura 6). Además de los dominios

catalíticos conservados existen otros dominios en la región citoplasmática de las cinasas como los dominios HAMP, GAF y PAS; casi el 33 % de las proteínas HK cuentan con un dominio PAS. Estos dominios son importantes módulos de señalización que monitorean cambios de luz, potencial redox, oxígeno, pequeños ligandos y niveles de energía en la célula (Galperin y Nikolskaya, 2007; Gao y Stock, 2009).

Por otra parte, las proteínas reguladoras de respuesta tienen un dominio REC o dominio receptor altamente conservado en el extremo N-terminal ligado a un dominio efector altamente variable en el extremo C-terminal (Figura 6). El dominio REC contiene el residuo de aspartato conservado importante por ser el sitio de fosforilación. Participa en la reacción de transferencia del grupo fosfato de la HK a la proteína RR y regula la actividad del dominio efector de una manera dependiente del estado de fosforilación (Galperin y Nikolskaya, 2007; Gao y Stock, 2009). Por su parte, el dominio efector es el encargado de generar una respuesta específica y la gran diversidad en estos dominios le confiere a las bacterias la capacidad de regular diferentes procesos en respuesta a cambios ambientales. La mayoría de los reguladores de respuesta contienen un dominio efector de unión a DNA; por lo tanto, la mayoría de los RR son reguladores transcripcionales. Las principales subfamilias a las que pertenecen estos reguladores transcripcionales son OmpR, NarL y NtrC (Galperin, 2006). Los otros dominios efectores presentes en los reguladores de respuesta son dominios con una actividad enzimática, dominios de interacción con otras proteínas o ligandos o dominios de unión a RNA. Además, existe un porcentaje de proteínas reguladoras de respuesta que solo contienen un dominio REC sin un dominio efector, estas proteínas pertenecen principalmente a las familias CheY o SpoOF, que participan en funciones de quimiotaxis o esporulación, respectivamente. La activación de estos dominios efectores depende del estado de fosforilación de la proteína. La fosforilación generalmente induce un cambio conformacional que favorece la formación de dímeros y la consecuente actividad del dominio efector. (Galperin, 2006; Galperin y Nikolskaya, 2007; Gao y Stock, 2009).



**Figura 6. Dominios funcionales de las proteínas HK y RR.** Se muestran los dominios generales de las proteínas que conforman los sistemas de dos componentes. El dominio sensor de las HK y el dominio efector de los RR son los más variables (Modificada de Gao y Stock, 2009).

## 6. Regulación transcripcional del pili tipo IV

La necesidad de controlar la biogénesis del pili en respuesta a cambios ambientales es probable que haya contribuido a la evolución de un mecanismo regulatorio complejo. Además, la capacidad de reciclar monómeros de pilina para ser utilizados en rondas posteriores de ensamble provee un mecanismo por el cual la bacteria puede monitorear la cantidad de pilina disponible (Kilmury y Burrows, 2016).

La regulación transcripcional del gen *pilA*, que es el gen que codifica para la proteína estructural del pili, se ha evaluado en muchas bacterias incluyendo *P. aeruginosa*, *M. xhantus*, *K. kingae*, *X. axonopodis*, entre otros. En estos microorganismos el gen *pilA* es expresado por un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  (RpoN) y regulado por un sistema de dos componentes (TCS) PilS-PilR (Bretl *et al.*, 2016; Hobbs *et al.*, 1993; Ishimoto y Lory, 1989; Kehl-Fie *et al.*, 2009; Mattick, 2002; Samuel y Kaiser, 1997). Sin embargo, algunas bacterias como *Neisseria* expresan pili tipo IV pero no tienen homólogos para el TCS PilS-PilR y para  $\sigma^{54}$ , en estos microorganismos la expresión de *pilA* es regulada por  $\sigma^{70}$  (Carrick *et al.*, 2000).

El factor  $\sigma^{54}$  es una subunidad de la RNA polimerasa codificada por el gen *rpoN*, que dirige la transcripción de genes requeridos bajo condiciones específicas por medio del reconocimiento de elementos promotores que incluyen el dinucleótido GC en la región -12 y el dinucleótido GG en la región -24 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Buck y Cannon, 1992). El complejo formado por RpoN y la RNA polimerasa se une a la región promotora de sus genes blanco, pero permanece en una configuración cerrada. La conversión a una configuración abierta requiere de activadores transcripcionales tipo EBP (Enhancer Binding Protein) (Studholme y Dixon, 2004). En el caso de la expresión de *pilA*, la proteína PilR es una proteína tipo EBP y el regulador de respuesta del TCS PilS-PilR. Los reguladores de respuesta que también actúan como proteínas tipo EBP pertenecen a la familia NtrC en la cual es característico la presencia de un dominio de unión a ATP, además del dominio de unión al DNA como dominio efector (Gao y Stock, 2009).

El sistema de dos componentes PilS-PilR y el factor  $\sigma^{54}$  no son los únicos reguladores de la transcripción de *pilA*. Para que los activadores transcripcionales tipo EBP puedan activar completamente la transcripción de sus genes blanco se requiere de proteínas accesorias tipo IHF (Integration Host Factor). Las proteínas IHF son proteínas tipo histona que se unen al DNA en secuencias específicas donde promueven rearrreglos en la estructura del DNA y por tanto participan en procesos celulares como replicación, transcripción y recombinación sitio específica (Dorman, 2009; Fiévet *et al.*, 2014; Swinger y Rice, 2004). Estas proteínas tipo IHF son necesarias en la transcripción de genes regulados por  $\sigma^{54}$  y EBP, ya que usualmente las proteínas EBP se unen a

secuencias de DNA río arriba del promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  y por lo tanto es necesario la formación de un loop o doblez del DNA que permita la interacción de estas dos proteínas. La modificación de la estructura del DNA es inducida por la presencia de IHF y es un proceso que requiere energía (Wigneshweraraj *et al.*, 2008).

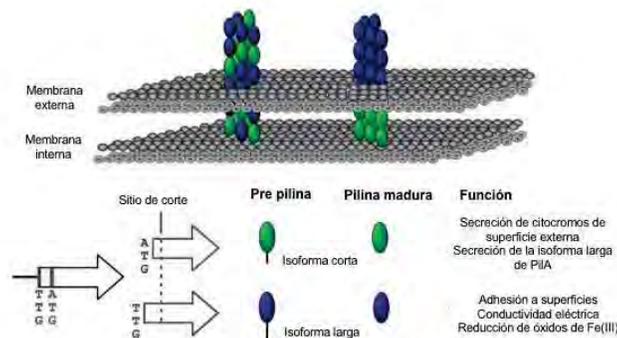
### 6.1. Regulación de la expresión de *pilA* en *G. sulfurreducens*

La expresión de la pilina en *G. sulfurreducens*, al igual que en otros microorganismos que expresan el gen *pilA*, depende del factor  $\sigma^{54}$  y el sistema de dos componentes PilS-PilR. Estos reguladores son esenciales para otros procesos importantes en *Geobacter*. Mediante estudios de transcriptoma se ha demostrado que el factor transcripcional  $\sigma^{54}$  (RpoN) regula un gran número de genes que participan en varias funciones celulares incluyendo aquellos que codifican enzimas para la asimilación de amonio, proceso que es esencial bajo todas las condiciones de crecimiento de *G. sulfurreducens*.  $\sigma^{54}$  también regula genes que son importantes para el crecimiento en el subsuelo y la producción de electricidad en MFC, como genes involucrados en la biosíntesis del flagelo, biosíntesis del pili y citocromos tipo *c* (Lovley, 2011).

Además, *G. sulfurreducens* cuenta con un total de 28 genes que codifican para factores de transcripción tipo EBP, los cuales interaccionan con el factor  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción de sus genes blanco. Este número de EBPs es mucho más alto que el encontrado en la mayoría de las bacterias (Karlín *et al.*, 2006; Methé *et al.*, 2003). Por ejemplo, *E. coli*, que tiene un genoma más grande (4.6 Mb) que *G. sulfurreducens* (3.8 Mb), tiene solo 12 EBPs (Karlín *et al.*, 2006; Reitzer y Schneider, 2001). Aproximadamente la mitad de las EBPs en *G. sulfurreducens* pertenecen a sistemas de dos componentes y el genoma de *Geobacter* codifica para un gran número de proteínas pertenecientes a estos sistemas, específicamente 90 HK y 93 RR (Coppi *et al.*, 2001; Methé *et al.*, 2003). La mayoría de los dominios sensores de los sistemas de dos componentes en especies de *Geobacter* son únicos o muestran similitud a sistemas no caracterizados en otras bacterias. Algunas proteínas de los TCS tienen motivos de unión a grupos hemo de los citocromos tipo *c* y pueden participar en el control redox de procesos biológicos complejos en las especies de *Geobacter*.

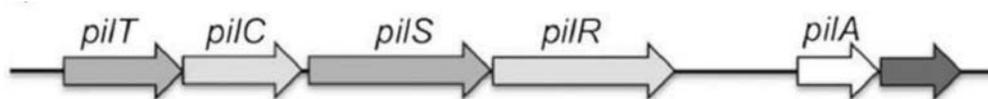
En *G. sulfurreducens*, el gen *pilA* tiene dos sitios de inicio de la transcripción y dos sitios de inicio de la traducción, lo que da origen a dos isoformas de la proteína PilA nombradas como pre pilina corta y pre pilina larga. Ambas isoformas tienen el mismo sitio de corte para la proteasa PilD, lo que da origen a dos pilinas maduras idénticas (Juárez *et al.*, 2009; Richter *et al.*, 2012). Se ha reportado que las dos isoformas son funcionales e intervienen en diferentes procesos. La isoforma corta es necesaria para la secreción de citocromos tipo *c* como OmcS y OmcZ y para la secreción de la isoforma larga de PilA

a la superficie externa de la célula. Mientras que la isoforma larga es necesaria para la adhesión a superficies, la conductividad eléctrica y la reducción de óxidos de Fe(III) insolubles, procesos en los que esta involucrado el pili tipo IV (Figura 7) (Richter *et al.*, 2012). La transcripción de las dos pre pilinas depende de dos subunidades diferentes de la RNA polimerasa, la isoforma corta tiene un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$  y la isoforma larga tiene un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$  (Juárez *et al.*, 2009). Por lo tanto, los reguladores hasta ahora estudiados de la pilina, incluyendo al sistema de dos componentes PilS-PilR, participan en la regulación de la transcripción de la isoforma larga, la cual es importante para los procesos en los que participa el pili tipo IV (Hernández *et al.*, 2016, 2017).



**Figura 7. Modelo del ensamblaje del pili y función de las isoformas de PilA.** En *G. sulfurreducens* se generan dos isoformas funcionales de la pre pilina, cada una de ellas participa en diferentes funciones. Ambas isoformas tienen el mismo sitio de corte, por lo que generan pilinas maduras idénticas. Se han propuestos dos modelos del ensamblaje del pili: Modelo 1 (izquierda) sugiere que PilA es derivada de ambas isoformas, y que la pilina derivada tanto de la isoforma corta como de la larga están incorporadas en la fibra del pili. Modelo 2 (derecha) sugiere que la pilina madura derivada de la isoforma corta es intracelular y forma la base de la fibra del pili mientras que la pilina madura derivada de la isoforma larga es secretada para formar el filamento del pili (Modificada de Richter *et al.*, 2012).

El sistema de dos componentes PilS-PilR en *G. sulfurreducens* no sólo regula la producción de PilA, sino también la expresión de diversos genes involucrados en la transferencia de electrones y la producción de biofilm (Juárez *et al.*, 2009). Los genes que codifican para las proteínas PilS y PilR se encuentran dentro de un operón junto con otros genes que son importantes para el ensamblaje y función del pili tipo IV (Figura 8).

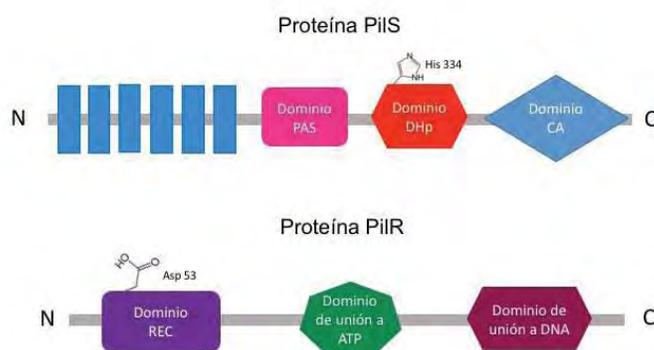


**Figura 8. Contexto genético de las proteínas PilS-PilR en *G. sulfurreducens*.** Los genes que codifican para las proteínas PilS y PilR están dentro de un operón junto con otros genes importantes para el ensamblaje y función del pili tipo IV.

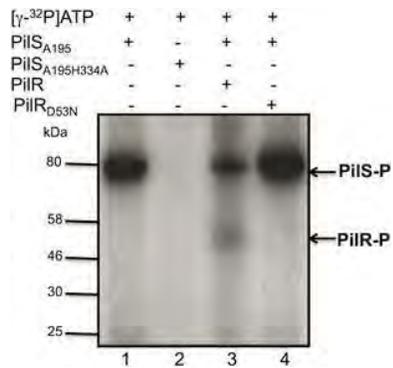
Debido a que el pili tipo IV de *G. sulfurreducens* es esencial para el proceso de transferencia de electrones, tiene una regulación compleja. Por lo que además del factor  $\sigma^{54}$  y el sistema de dos componentes PilS-PilR, se ha demostrado la participación de otros reguladores como IHF y FLP 1 y 2 (homólogos de la familia CRP-FNR) (Hernández *et al.*, 2016). Por esta razón, es importante caracterizar el sistema de dos componentes PilS-PilR de *G. sulfurreducens* y su participación en la regulación de proteínas importantes en el proceso de transferencia extracelular de electrones.

## IV. ANTECEDENTES

Se han realizado estudios para caracterizar el sistema de dos componentes PiIS-PiIR de *G. sulfurreducens*. Hasta ahora se conoce que PiIS es la proteína histidina cinasa, tiene un tamaño de 550 aminoácidos y un peso molecular de 60.3 kDa. Mediante herramientas bioinformáticas se determinaron los dominios de la proteína PiIS; presenta un dominio transmembrana en el extremo N-terminal (con 6 motivos transmembrana), un dominio PAS, un dominio DHp y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Figura 9). Por otra parte, PiIR es la proteína reguladora de respuesta perteneciente a la subfamilia NtrC (Gao y Stock, 2009). Tiene 458 aminoácidos y un peso molecular de 51.4 kDa. Un análisis *in silico* de su secuencia de aminoácidos muestra los tres dominios característicos de EBPs bacterianas dependientes de  $\sigma^{54}$ : en el N-terminal un dominio REC (o RR), un dominio central con actividad de ATPasa y un dominio de unión a DNA en el extremo C-terminal (Figura 9) (<http://www.genome.jp/kegg/>). Mediante estudios bioinformáticos se propuso que los sitios de fosforilación específicos son: una histidina en la posición 334 en PiIS y un aspartato en la posición 53 en PiIR. Mediante ensayos de fosforilación y fosfotransferencia *in vitro* se determinó que la proteína PiIS se autofosforila y después transfiere este grupo fosfato a la proteína PiIR y se demostró que la histidina 334 en PiIS y el aspartato 53 en PiIR son los sitios de fosforilación, debido a que las mutaciones H334A en PiIS y D53N en PiIR construidas por mutagénesis sitio dirigida, impiden la autofosforilación y fosfotransferencia *in vitro* (Figura 10) (Hernández *et al.*, 2017).

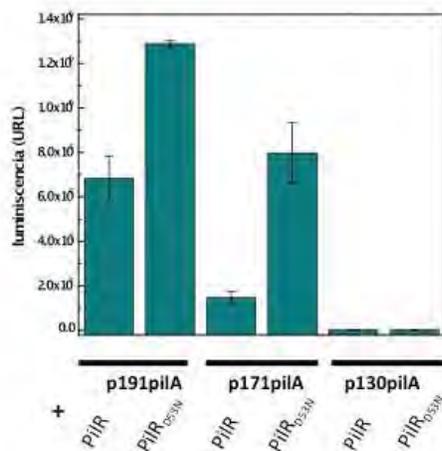


**Figura 9. Dominios estructurales de las proteínas PiIS-PiIR de *G. sulfurreducens*.** La proteína PiIS es la proteína histidina cinasa. La proteína PiIR es el regulador de respuesta y una proteína tipo EBP. Los dominios presentes en ambas proteínas están esquematizados en la imagen. Se indican también la posición de los sitios de fosforilación en ambas proteínas.



**Figura 10. Ensayos de autofosforilación y fosfotransferencia *in vitro* de las proteínas PilS-PilR.** La proteína PilS tiene la capacidad de autofosforilarse (1) y transferir el grupo fosfato a la proteína PilR (3). Los sitios de fosforilación son la histidina 334 en PilS y el aspartato 53 en PilR, cuando se cambian estos aminoácidos se pierde la capacidad de fosforilación (2 y 4) (Modificada de Hernández *et al.*, 2017).

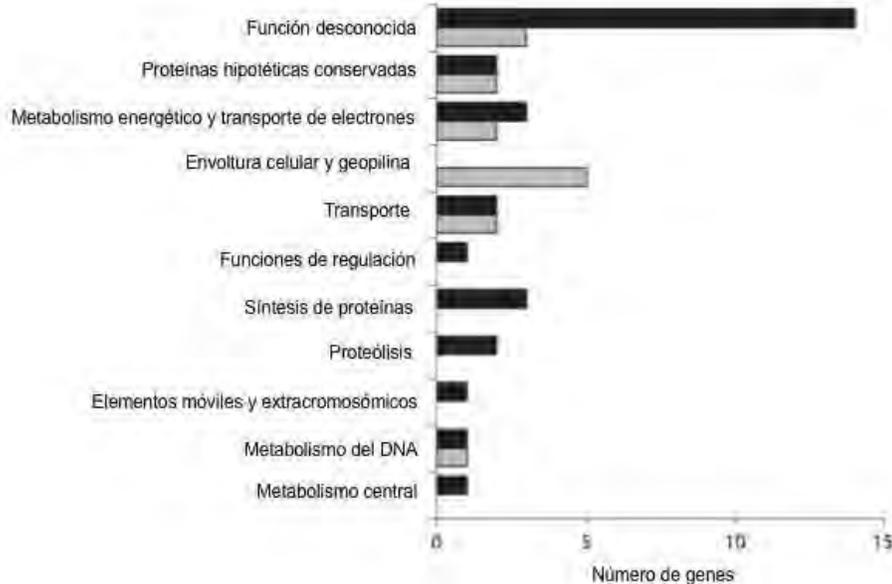
Una vez que se determinaron los sitios de fosforilación de las proteínas PilS y PilR y sabiendo que PilR activa la expresión de *pilA* de manera directa (Hernández *et al.*, 2017; Krushkal *et al.*, 2010). El siguiente paso fue evaluar el efecto del estado de fosforilación de PilR en la expresión de *pilA*. Para ello, se midió la actividad de la proteína PilR y la mutante PilR<sub>D53N</sub>, en fusiones transcripcionales con diferentes fragmentos de la región promotora de *pilA* ligados al gen reportero *luxCDABE*. Se observó que la variante no fosforilable de PilR (PilR<sub>D53N</sub>) activaba más fuertemente la fusión que la proteína PilR (Figura 11) (Hernández *et al.*, 2017).



**Figura 11. Expresión de la fusión *PpilA::luxCDABE* por PilR y PilR<sub>D53N</sub>.** La proteína PilR<sub>D53N</sub> activó más fuertemente las fusiones transcripcionales, sugiriendo que es el estado no fosforilado de la proteína PilR la que favorece la expresión de *pilA* (Modificada de Hernández *et al.*, 2017).

Existen pocos ejemplos donde el RR activa la expresión de genes en su forma no fosforilada. En *B. subtilis* el TCS DgeS-DegU controla la expresión de diversos genes involucrados en la formación de biofilm y flagelo, la forma no fosforilada de DegU regula directamente la expresión del gen *comK*, el cual codifica un activador transcripcional (Hamoen *et al.*, 2000; Shimane y Ogura, 2004). En *P. aeruginosa* la forma no fosforilada de los reguladores de respuesta AlgB y AlgR es requerida para activar la producción del exopolisacárido alginato (Ma *et al.*, 1998). También se observó que en *S. enterica* serovar Typhimurium, la producción de biofilm es activada por la forma no fosforilada del RR CsgD (Zakikhany *et al.*, 2010).

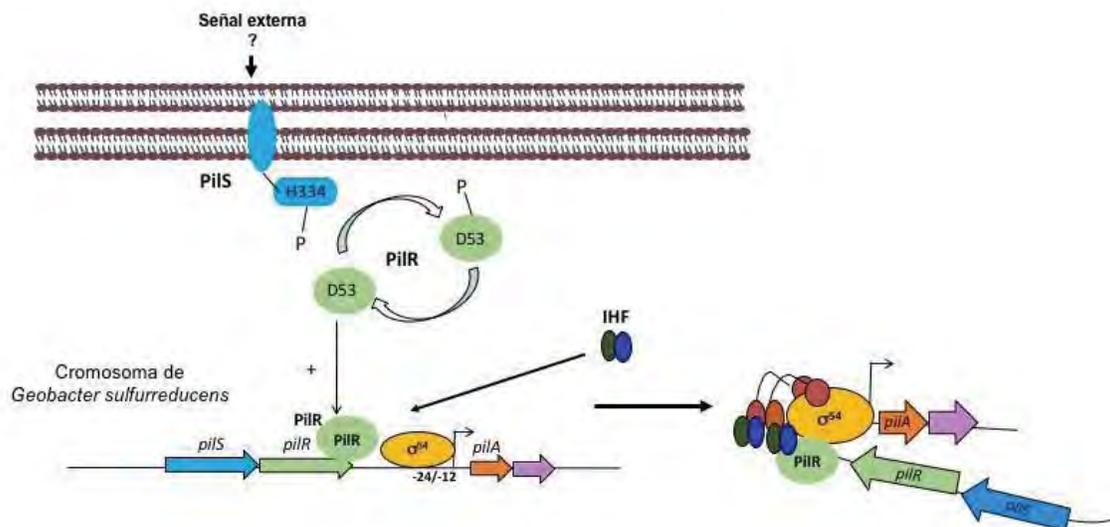
Por otro lado, se ha caracterizado una cepa deficiente en PilR en *G. sulfurreducens*. Se observó que esta proteína es necesaria para la expresión de *pilA* y que PilR regula además la expresión de una amplia variedad de genes incluyendo aquellos que participan en la expresión de varios citocromos, formación de biofilm y genes de función desconocida (Figura 12) (Juárez *et al.*, 2009).



**Figura 12. Genes diferencialmente expresados en la mutante PilR- de *G. sulfurreducens*.** PilR es un regulador global en *Geobacter*. La mutante PilR- muestra 44 genes diferencialmente expresados identificados por análisis de microarreglos. Las barras negras representan genes sobre expresados y las barras grises genes sub expresados (Modificada de Juárez *et al.*, 2009).

Finalmente, como ya se ha mencionado, el sistema de dos componentes PilS-PilR es el principal mecanismo de regulación de *pilA*, pero no es el único. Los activadores transcripcionales tipo EBP generalmente requieren de proteínas tipo IHF para activar la expresión de sus genes blanco. *G. sulfurreducens* tiene 4 genes que codifican para diferentes subunidades del complejo IHF, dos para la subunidad  $\alpha$  (*ihf $\alpha$ 1* e *ihf $\alpha$ 2*) y dos para la subunidad  $\beta$  (*ihf $\beta$ 1* e *ihf $\beta$ 2*) y las mutantes deficientes en estos 4 genes ya han sido estudiadas. Los resultados indican que las mutantes  $\Delta$ *ihf $\alpha$ 1*,  $\Delta$ *ihf $\alpha$ 2* y  $\Delta$ *ihf $\beta$ 2* presentan un retraso en el crecimiento en un medio con fumarato como aceptor de electrones y son deficientes en la reducción de Fe(III) soluble, mientras que la cepa  $\Delta$ *ihf $\beta$ 1* presenta características similares a la cepa WT con ambos aceptores de electrones. También se observó que hay una disminución en el nivel de transcrito y de proteína de PilA en las 4 cepas mutantes a pesar de que no hubo diferencia en el crecimiento de la cepa  $\Delta$ *ihf $\beta$ 1* comparada con la cepa WT, por lo tanto estos reguladores son importantes para la expresión de otros genes involucrados en la transferencia de electrones (Hernández *et al.*, 2016).

Con los resultados obtenidos se ha propuesto el siguiente modelo para la regulación transcripcional de *pilA*: PilS detecta una señal externa (desconocida) y se autofosforila en His-334, este grupo fosfato es después transferido a Asp-53 en PilR, pero a diferencia del mecanismo establecido para los sistemas de dos componentes, donde el regulador de respuesta en un estado fosforilado activa la expresión de sus genes blanco, es la forma no fosforilada de PilR la que activa la transcripción de *pilA*. Además, para que exista una correcta activación de la transcripción, IHF se une entre el promotor y el sitio de unión a PilR, para favorecer la interacción entre PilR y  $\sigma^{54}$  (Figura 13) (Hernández *et al.*, 2016, 2017).



**Figura 13. Mecanismo de regulación de la expresión de *pilA* por el TCS PilS-PilR en *G. sulfurreducens*.** Se representa el mecanismo propuesto de la regulación de *pilA* en el que participa el sistema de dos componentes PilS-PilR y el complejo IHF. Modificada de Hernández *et al.*, 2017.

Como los estudios realizados en nuestro grupo con el sistema de dos componentes PilS-PilR se han llevado a cabo *in vitro* y/o expresando los componentes en un huésped heterólogo: *Escherichia coli*. El siguiente paso en la caracterización del TCS es generar la mutante PilR<sub>D53N</sub> en *G. sulfurreducens* y analizar los cambios en la expresión de genes necesarios para el proceso de transferencia de electrones como PilA, citocromos y la producción de biofilm, para comprobar el mecanismo propuesto hasta la fecha.

## V. JUSTIFICACIÓN

El estudio y manipulación genética de microorganismos productores de bioelectricidad, los cuales pueden acoplar la oxidación de materia orgánica con la transferencia de electrones a electrodos con la generación de electricidad en sistemas bioelectroquímicos, ha permitido obtener cepas mejoradas que potencialmente podrían emplearse en dichos dispositivos para incrementar su eficiencia. Uno de los organismos más estudiados para este fin es *G. sulfurreducens*, cuya transferencia extracelular de electrones está asociada con la producción de pili y biofilm. Por tanto, consideramos que es importante estudiar los mecanismos que regulan la expresión del pili y la formación de biofilm para poder generar mutantes con una mayor capacidad de transferencia de electrones.

## VI. HIPÓTESIS

La variante no fosforilable del regulador de respuesta PilR en *Geobacter sulfurreducens* favorecerá la expresión de *pilA*, citocromos tipo *c* y otros genes relacionados en el proceso de transferencia extracelular de electrones.

## VII. OBJETIVOS

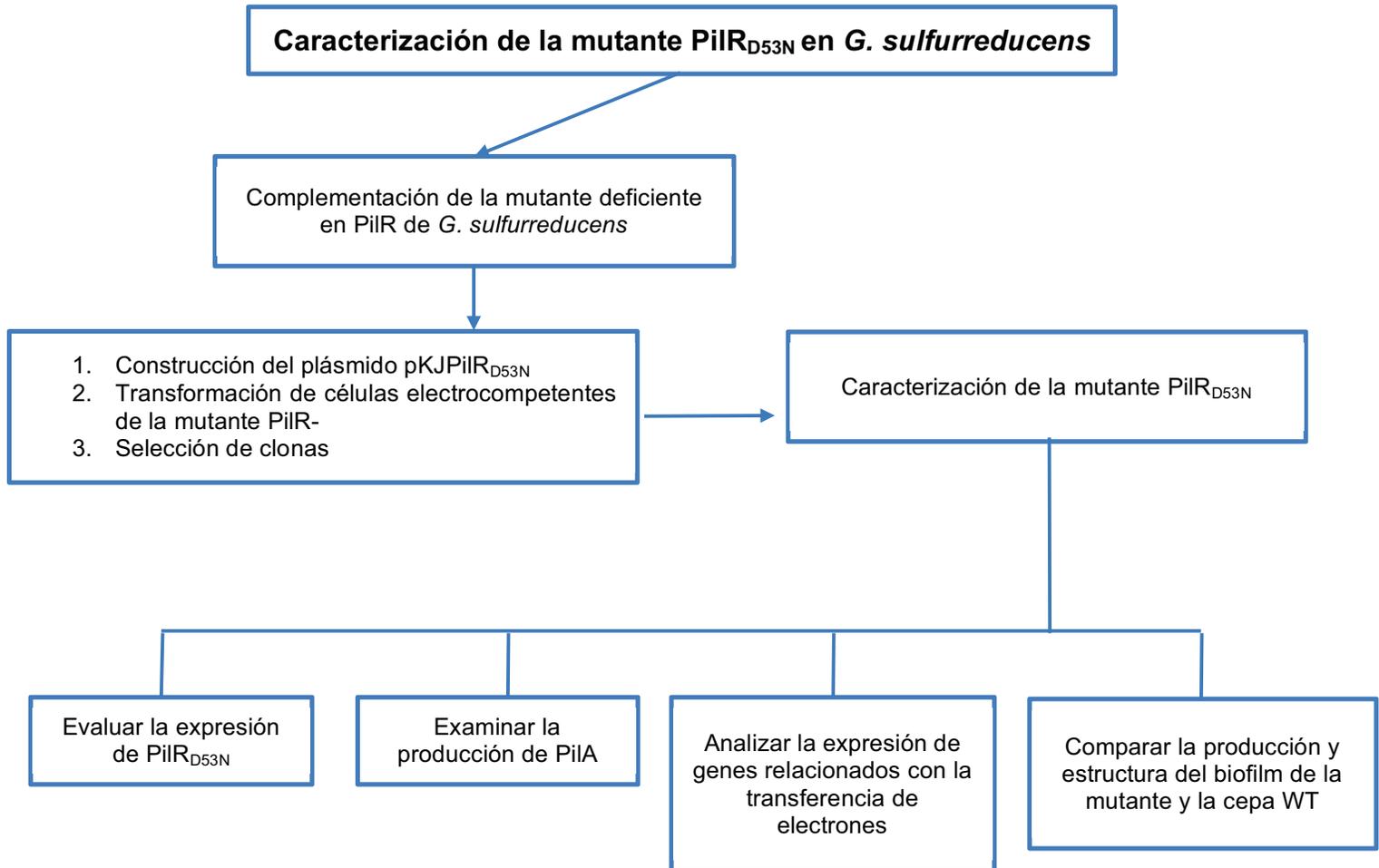
### 1. Objetivo general:

Caracterizar la mutante PilR<sub>D53N</sub>, la cual genera una variante no fosforilable del regulador de respuesta del sistema de dos componentes PilS-PilR en *Geobacter sulfurreducens*.

### 2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de una variante PilR no fosforilable en la mutante PilR- de *G. sulfurreducens*.
- Evaluar el nivel de expresión de *pilA*, citocromos tipo *c* y otros genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones.
- Analizar la producción y estructura del biofilm en la mutante estudiada.

## VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron las cepas bacterianas que se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

**Tabla 1. Cepas bacterianas**

Cepa	Características	Referencia
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Cepa silvestre DL1	(Caccavo <i>et al.</i> , 1994)
PilR-	Mutante deficiente en PilR en <i>G. sulfurreducens</i> . El gen <i>pilR</i> fue interrumpido con un casset de resistencia a kanamicina.	(Juárez <i>et al.</i> , 2009)
<i>Escherichia coli</i> XL-1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)].	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>Escherichia coli</i> MC1601	<i>araD139 araA-leu7697 lacX74 galK16 galE15(GalS) lambda-e14-mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2</i>	(Casadaban <i>et al.</i> , 1980)

### 2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo así como los construidos durante el desarrollo del mismo se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Plásmidos utilizados**

Plásmido	Características	Referencia
pBADPilR	Gen <i>pilR</i> de <i>G. sulfurreducens</i> clonado en el vector pBAD-HisA. Amp <sup>R</sup>	(Hernández <i>et al.</i> , 2017)
pBADPilR <sub>D53N</sub>	Gen <i>pilR</i> de <i>G. sulfurreducens</i> con la mutación D53N clonado en el vector pBAD-HisA. Amp <sup>R</sup>	(Hernández <i>et al.</i> , 2017)
pRG5	Vector de clonación para <i>G. sulfurreducens</i> . Sp <sup>R</sup>	(B. Kim <i>et al.</i> , 2005)
pKJPilR	Gen <i>pilR</i> de <i>G. sulfurreducens</i> clonado en el vector pRG5. Sp <sup>R</sup>	(Juárez <i>et al.</i> , 2009)
pKJPilR <sub>D53N</sub>	Gen <i>pilR</i> de <i>G. sulfurreducens</i> con la mutación D53N clonado en el vector pRG5. Sp <sup>R</sup>	Este trabajo
pCS26-Pac	Operón luxCDABE de <i>Photobacterium luminescens</i> . Km <sup>R</sup>	(Bjarnason <i>et al.</i> , 2003)
p191pilA	Plásmido pCS26-Pac con 191 pb de la región promotora de <i>pilA</i> . Km <sup>R</sup>	(Hernández <i>et al.</i> , 2017)

### 3. Oligos

La secuencia de los oligos utilizados en este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 3. Oligos**

Oligo	Secuencia	Observaciones
PilRFw	TCG TAG TGG ACG ATG AAC TGA	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen <i>pilR</i> (a partir de la base 17)
PilRRv	GTT TAC CCG CGT GGA GCT	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen <i>pilR</i> (hasta la base 1771)
qPCRrecAFw	GTG AAG GTG GTC AAG AAC AAG GT	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen <i>recA</i> . Utilizado para PCR en tiempo real. Genera un producto de 78 pb
qPCRrecARv	GGA AAT GCC CTC ACC GTA GTA A	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen <i>recA</i> . Utilizado para PCR en tiempo real.
qPCRomcBFw	GGA GTA TGT GGC ATC CCT TG	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen <i>omcB</i> . Utilizado para PCR en tiempo real. Genera un producto de 106 pb
qPCRomcBRv	ACC GTT GGC ATT CGT ATC TC	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen <i>omcB</i> . Utilizado para PCR en tiempo real.
qPCRomcSFw	TCC TAC CAG AAC AGC AAC GA	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen <i>omcS</i> . Utilizado para PCR en tiempo real. Genera un producto de 102 pb
qPCRomcSRv	ATA GGA ACC GCT CAG GGA CT	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen <i>omcS</i> . Utilizado para PCR en tiempo real.
qPCRpilAFw	ATC GGT ATT CTC GCT GCA AT	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen <i>pilA</i> . Utilizado para PCR en tiempo real. Genera un producto de 116 pb
qPCRpilARv	AAT GCG GAC TCA AGA GCA GT	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen <i>pilA</i> . Utilizado para PCR en tiempo real.
GSU1501Fw	CGA GGT CTT TGG TTT CCT TG	Oligo Fw para amplificar un fragmento del gen GSU1501. Utilizado para PCR en tiempo real. Genera un producto de 118 pb
GSU1501Rv	TGG GAT GCT TTC TCC CAT TA	Oligo Rv para amplificar un fragmento del gen GSU1501. Utilizado para PCR en tiempo real.

Se indica el tamaño del producto esperado con los oligos utilizados para qPCR solo en el oligo forward de cada par de oligos.

#### 4. Medios de cultivo

**LB** (Luria Bertani): medio de cultivo para el crecimiento de las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo (Sambrook *et al.*, 1989).

**NBAF**: medio de cultivo para el crecimiento de *G. sulfurreducens*, el donador de electrones es el acetato de sodio y el aceptor de electrones es el fumarato de sodio. Está compuesto de 40 mL  $C_4H_2Na_2O_4$  1 M, 10 mL 100X NB Sales, 10 mL 100X NB Mineral Elixir, 15 mL DL vitaminas, 10 mL  $CaCl_2$  0.4%, 10 mL  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1%, 1.8 g  $NaHCO_3$ , 0.5 g  $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ , 1 mL  $Na_2SeO_4$  1mM y 1.20 g  $C_2H_3NaO_2$ . Después de aforar el volumen a 1 L, agregar 0.5 mL de resazurina 0.1% (Coppi *et al.*, 2001)

**Citrato Férrico**: medio de cultivo para el crecimiento de *G. sulfurreducens* y los ensayos de reducción de Fe(III) soluble. En este medio el donador de electrones es el acetato de sodio y el aceptor son los óxidos de Fe solubles. Su composición es: 13.7 g Citrato Férrico, 10 mL DL vitaminas, 10 mL DL minerales, 2.5 g  $NaHCO_3$ , 0.25 g  $NH_4Cl$ , 0.06 g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 0.1 g KCl, 1 mL  $Na_2SeO_4$  1 mM y 500 mL NaOH 0.15 N para 1 litro (Coppi *et al.*, 2001).

Debido a que *G. sulfurreducens* es una bacteria anaerobia, los medios de cultivo fueron empleados en condiciones anaeróbicas. Para esto, el medio de cultivo fue burbujeado en una estación de gaseo con una mezcla 80:20  $N_2:CO_2$ .

Todos los medios de cultivo se esterilizaron por autoclave a 121 °C por 20 minutos.

#### 5. Condiciones de cultivo

*E. coli* fue cultivada en medio LB a 37 °C.

*G. sulfurreducens* fue cultivado a 25 o 30 °C bajo condiciones anaeróbicas estrictas. El medio NBAF es suplementado con 0.1 % de extracto de levadura y 1 mM de cisteína y el medio citrato férrico con 2 M de acetato de sodio.

Cuando fue requerido, se adicionó al medio de cultivo los siguientes antibióticos a una concentración final de: Ampicilina 200  $\mu g/mL$ , Espectinomicina 500  $\mu g/mL$  o Kanamicina 300  $\mu g/mL$ .

## 6. Complementación de la mutante deficiente en PilR de *G. sulfurreducens*

### 6.1 Extracción de DNA plasmídico

Se utilizaron 6 mL de cultivo para hacer la extracción de DNA plasmídico. Primero se recuperaron las células por centrifugación y posteriormente se llevo a cabo la extracción utilizando el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche, siguiendo las indicaciones del proveedor. Finalmente, el DNA plasmídico se eluyó con 30  $\mu$ L de agua Mili-Q.

### 6.2 Construcción del plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub>

Para generar la construcción pKJPilR<sub>D53N</sub> necesaria para complementar la mutante PilR- de *G. sulfurreducens* se realizó una doble digestión con las enzimas SphI y BglII (Thermo Fisher Scientific) de los plásmidos pKJPilR (Juárez *et al.*, 2009) y pBADPilR<sub>D53N</sub> (Hernández *et al.*, 2017). La reacción se preparó en un volumen final de 50  $\mu$ L colocando 4  $\mu$ L de Buffer B (Thermo Fisher Scientific), 3  $\mu$ L de SphI, 3  $\mu$ L de BglII, 30  $\mu$ L de plásmido (100-150 ng/ $\mu$ L) y 10  $\mu$ L de agua Mili-Q. Se incubó la reacción a 37 °C por 3 horas.

### 6.3 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para visualizar la integridad del DNA utilizado se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Como referencia se uso el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix. Después de la electroforesis, los geles se visualizaron con un fotodocumentador (Gel Doc EZ Imager Bio-Rad) (Sambrook *et al.*, 1989).

### 6.4 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de interés a partir de una banda de gel de agarosa se empleó el kit High Pure PCR Product Purification de Roche siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA obtenido se recuperó eluyendo con 20  $\mu$ L de agua Mili-Q y la concentración se determinó por Nano-Drop.

### 6.5 Ligación de fragmentos de DNA

Para las reacciones de ligación se ocupó la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific) y el buffer 5X T4 DNA ligasa (Invitrogen). La reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L adicionando lo siguiente: 4  $\mu$ L de buffer, 5 U de T4 DNA ligasa, de 20 a 100 ng de vector y el DNA a insertar en una relación 3:1 inserto:vector, ajustando el volumen con agua Mili-Q. Las reacciones de ligación se incubaron a 16 °C durante toda la noche.

### 6.6 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

Para preparar células quimiocompetentes de *E. coli* se utilizaron 200 mL de cultivo en medio LB con una densidad óptica a 600 nm de 0.5 y se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Para transformar, se usaron 100  $\mu$ L de células quimiocompetentes y se mezclaron con 10  $\mu$ L de la reacción de ligación. Posteriormente

se dio el choque térmico y después de dejar recuperando las células en medio LB a 37 °C por una hora, se plaquearon 200 µL del cultivo en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente.

### **6.7 Preparación de células electrocompetentes de *G. sulfurreducens***

Las células electrocompetentes de *G. sulfurreducens* se realizaron a partir de cultivos en medio NBAF como se describió previamente (Coppi *et al.*, 2001). Todo el procedimiento se llevo a cabo en una cámara anaeróbica y cualquier buffer utilizado estaba en condiciones anóxicas y frío. Primeramente se recuperaron las células de 400 mL de cultivo en medio NBAF con una densidad óptica a 600 nm entre 0.2 y 0.4 por centrifugación a 4 °C por 8 minutos a 4300 xg. Posteriormente se desechó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con 200 mL de buffer de electroporación (1 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 175 mM de sacarosa), centrifugando después de cada lavado. Finalmente, se ocupó un volumen adecuado de 60% Dimetil sulfóxido (DMSO) - 40% buffer de electroporación para resuspender las células y se hicieron alícuotas de 60 µL. Las células electrocompetentes resultantes fueron utilizadas para electroporar inmediatamente o almacenadas a -70 °C. Para transformar, se usaron 60 µL de células y 3 µL de plásmido (200 ng/µL), ambos fueron colocados en una celda para electroporar previamente enfriada. El pulso eléctrico fue dado a 1.8 mV e inmediatamente se agregó 1 mL de medio NBAF. Posteriormente, con una jeringa de insulina se recuperaron las células de la celda para electroporar y se inocularon en un tubo con 10 mL de medio NBAF anaeróbico. Se incubaron las células por 2 días a 30 °C. Después de este tiempo, las células se plaquearon en medio NBAF sólido anaeróbico con espectinomicina como marcador de resistencia. Para esto, primeramente se obtuvieron las células por centrifugación a 14000 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 µL de medio NBAF los cuales fueron tomados con una jeringa de insulina e inoculados en NBAF sólido. Finalmente, los cultivos se incubaron por 1 semana y media (o hasta observar colonias) a 30 °C. Para recuperar las colonias obtenidas se realizó el siguiente procedimiento en la cámara anaeróbica: con un palillo se tomó una colonia la cual fue resuspendida en 200 µL de medio NBAF en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente con una jeringa de insulina se tomó el medio NBAF que tenía la colonia resuspendida y se inoculó en 10 mL de medio NBAF anóxico con espectinomicina. Los tubos se incubaron a 30 °C por 3 días.

## 7. Caracterización de la mutante PiIR<sub>D53N</sub> en *G. sulfurreducens*

### 7.1 Comprobación de la adecuada expresión y actividad de PiIR<sub>D53N</sub>

#### 7.1.1 Extracción de proteínas

Para extraer proteínas de cultivos de *E. coli* o *G. sulfurreducens* se utilizó el reactivo B-PER II (Bacterial Protein Extraction Reagent) de Thermo Fisher Scientific. Para la extracción de proteínas se ocuparon 10 mL de cultivo en medio NBAF de *G. sulfurreducens* o 50 mL en medio LB de *E. coli*. Primeramente, se obtuvieron las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de B-PER II. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de este tiempo, se sonicaron con tres pulsos por 10 segundos. Posteriormente, para eliminar los restos celulares las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante donde se encuentran las proteínas solubles. Finalmente se realizó la cuantificación de proteínas por Nano-Drop.

#### 7.1.2 Electroforesis de proteínas

Se hicieron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para analizar las extracciones de proteínas, para evaluar el proceso de purificación de proteínas y para llevar a cabo la identificación de proteínas por inmunoblot. Para esto, una cantidad específica de proteína (5-60  $\mu$ g) se mezcló con un volumen de buffer de carga 5X (0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 2.5 % SDS, 50 % Glicerol, 100  $\mu$ L de B-mercaptoetanol y 50  $\mu$ g de Azul de Bromofenol) y se siguió el protocolo descrito en Sambrook *et al.*, 1989. Se usó como referencia el marcador PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

#### 7.1.3 Purificación de la proteína PiIR

El marco de lectura abierto de la proteína PiIR de *G. sulfurreducens* fue clonado en el vector pBAD-HisA que tiene un promotor dependiente de arabinosa y agrega en el extremo N-terminal una marca de 6 residuos de histidina que permiten la purificación por resina de níquel. Para la purificación de esta proteína se utilizó un cultivo de 100 mL en medio LB a partir del cual se obtuvieron las células por centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Después de centrifugar, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2-5 mL de buffer de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl y 10 mM Imidazol) por gramo de peso seco. Posteriormente se agregó lisozima para una concentración final de 1 mg/mL y las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación las muestras se sonicaron 3 veces por 10 segundos. Se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. La proteína

PilR contenida en el sobrenadante, fue purificada por columna utilizando la resina Ni-NTA (Qiagen) siguiendo las especificaciones del proveedor.

#### **7.1.4 Purificación de anticuerpos vs PilR por inmunoblot**

Los anticuerpos que se unen a un polipéptido dado pueden ser purificados de un suero policlonal por una simple modificación de la técnica de inmunoblot. En el laboratorio se tenía un suero policlonal que contiene el anticuerpo contra la proteína PilR de *G. sulfurreducens*, por lo que se llevó a cabo el siguiente protocolo para purificar este anticuerpo. Primero, se realizó una electroforesis de la proteína PilR purificada en un gel preparativo desnaturante SDS-PAGE. Después, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente la membrana fue bloqueada y luego se incubó con el anticuerpo primario (3 mL de suero policlonal y 1 mL de BSA 0.3 %) por 3 horas. Luego de este tiempo se hicieron 3 lavados con PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) -Tween 0.3 % y 3 lavados con PBS 1X. En seguida de este paso, se cortó un fragmento de la membrana el cual se incubó con el anticuerpo secundario para determinar la localización de la proteína PilR y el resto de la membrana se guardó en PBS 1X a 4 °C. Una vez identificada la proteína PilR, se alineó este fragmento de membrana con la membrana guardada a 4 °C y se cortó la banda de interés (que contiene el anticuerpo unido a la proteína PilR); la cual fue incubada con 100 mM Glicina pH 2.5 por 2 minutos en un tubo falcón de 15 mL. Después de este tiempo se adicionó 1 M Tris pH 8 hasta neutralizar la solución. Finalmente se realizaron alícuotas del anticuerpo purificado utilizando BSA como agente estabilizante y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

#### **7.1.5 Inmunoblot para las proteínas PilA y PilR**

El Western Blot o Inmunoblot es una técnica analítica usada para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas. Por lo que se utilizó para identificar dos proteínas de interés: PilA y PilR en extractos proteicos de *G. sulfurreducens*. Para ello, luego de la electroforesis en gel desnaturante SDS-PAGE, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda usando buffer de ánodo (25 mM de Tris-Base y 20 % Metanol) y buffer de cátodo (25 mM de Tris-Base, 20 % Metanol y 40 mM Glicina) como buffers de transferencia a 200 mA por 2 horas. Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con BSA 3 % en PBS 1X al menos por 1 hora. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS 1X-Tween 0.3% y 3 lavados con PBS 1X, la duración de cada lavado fue de 5 minutos. En seguida de los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (PilA o PilR) en una dilución 1:1000 en PBS 1X-BSA 0.3 % durante 3 horas. Nuevamente se llevaron a cabo los lavados como en el paso anterior. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (anti-conejo IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina de Invitrogen) en una dilución 1:1000 en PBS 1X-BSA 0.3 % durante 2 horas. Se lavó la membrana como se indicó previamente y finalmente se reveló con 1 mL de solución NBT/BCIP.

### 7.1.6 Análisis de la expresión de la fusión transcripcional *pilA::luxCDABE* por PilR y PilR<sub>D53N</sub>

Luego de obtener los plásmidos pKJPilR y pKJPilR<sub>D53N</sub>, se decidió evaluar su actividad sobre la expresión del gen *pilA* en un sistema heterólogo, para ello se utilizó la fusión transcripcional *pilA::luxCDABE*. Primeramente se transformaron células quimiocompetentes de la cepa MC1601 de *E. coli* que tienen el plásmido p191pilA con los plásmidos pBADPilR, pBADPilR<sub>D53N</sub>, pKJPilR y pKJPilR<sub>D53N</sub>. Posteriormente se seleccionaron algunas de las colonias obtenidas para realizar precultivos en medio LB con los antibióticos correspondientes. De los precultivos, se tomó un inóculo para una dilución 1:100 en 6 mL de medio LB. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron una DO<sub>600nm</sub> de 0.3, cuando se alcanzó esta densidad se adicionó arabinosa 1 % o 1 mM IPTG para inducir la expresión de las proteínas PilR y PilR<sub>D53N</sub>. Después de 1.5 horas de inducción se tomó 1 mL de cultivo para medir luminiscencia.

## 7.2 Reducción de aceptores de electrones solubles

### 7.2.1 Curvas de crecimiento en medio NBAF

El medio NBAF tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor de electrones. Permite monitorear el crecimiento de *G. sulfurreducens* por espectroscopia y evaluar la reducción de fumarato. Las curvas de crecimiento se realizaron en tubos con 10 mL de medio NBAF anaeróbico utilizando 400 µL de cultivo en medio NBAF con una densidad óptica de 0.4 a 600 nm como preinóculo. Los cultivos se incubaron a 30 °C y se tomó muestra cada 12 horas por 3 días para medir la densidad óptica a 600 nm.

### 7.2.2 Ensayos de reducción de Fe(III)

El medio citrato férrico tiene acetato como donador de electrones y Fe(III) soluble como aceptor final de electrones, por lo que se utilizó para cuantificar la reducción de Fe(III) soluble por *G. sulfurreducens* mediante el ensayo de ferrocina. Primeramente, se pusieron cultivos en 10 mL de medio citrato férrico inoculados con 400 µL de cultivo en medio NBAF con una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. Los cultivos fueron incubados a 30 °C. Cada 12 horas se tomaron 100 µL de cultivo para medir la reducción de Fe(III) soluble de la siguiente manera: se realizó una digestión ácida adicionando 900 µL de 0.5 N HCl por cada 100 µL de muestra e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron 50 µL de la digestión ácida y se agregaron 2.45 mL de ferrocina (2 mM Ferrocina en 50 mM HEPES). Finalmente, se determinó la absorbancia a 562 nm. Como referencia se ocupó una curva estándar con concentraciones de Fe(II) conocidas.

### 7.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones

#### 7.3.1 Extracción de RNA

Se llevo a cabo la extracción de RNA a partir de 10 mL de cultivo en medio NBAF de *G. sulfurreducens* utilizando el RNeasy Mini Kit de Qiagen y siguiendo las especificaciones del proveedor. Para eluir el RNA obtenido se adicionaron 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa y finalmente se determinó la concentración por Nano-Drop, las muestras se guardaron a -70 °C hasta su uso.

#### 7.3.2 Extracción de DNA genómico

Se realizó la extracción de DNA genómico de 10 mL de cultivo en medio NBAF de las diferentes cepas de *G. sulfurreducens* con el kit MasterPure DNA Purification (Epicentre) y siguiendo las especificaciones del proveedor. El DNA obtenido fue resuspendido en 30  $\mu$ L de agua mili-Q.

#### 7.3.3 Tratamiento de RNA con DNasa I

El RNA que se obtuvo, fue usado para experimentos de qPCR, por esa razón se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) con el siguiente protocolo: a 3  $\mu$ g de RNA de cada muestra se le agregó 3  $\mu$ L de buffer de reacción 10X con  $MgCl_2$ , 2.5  $\mu$ L de DNasa, 0.5  $\mu$ L de RiboLock y se ajustó el volumen a 30  $\mu$ L con agua Mili-Q tratada con DEPC (Sigma). Las reacciones se incubaron a 37 °C por 30 minutos y al finalizar este tiempo se inactivó la enzima calentando a 65 °C por 10 minutos. Para verificar que el RNA tratado ya no tuviera DNA, se realizó una PCR para amplificar el gen *pilA* utilizando los oligos PilAFwd y PilARev y como templado el RNA tratado. Se ocupó como control positivo DNA de *G. sulfurreducens* de la cepa WT.

#### 7.3.4 Síntesis de cDNA

Para realizar la síntesis de cDNA se utilizó el RNA tratado con DNasa como templado y el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Se emplearon oligos específicos para los siguientes genes: *pilA*, *omcB*, *omcS*, GSU1501 y *recA* como control interno. Se preparó una mezcla del oligo reverso para cada gen a una concentración final entre 15-20 pmol. La reacción para la síntesis de cDNA se llevo a cabo de la siguiente manera: en un tubo de microcentrífuga estéril se adicionó 0.5  $\mu$ g de RNA, 1.75  $\mu$ L de la mezcla de oligos y agua libre de RNasa para un volumen final de 12.5  $\mu$ L. Se incubó la reacción a 65 °C por 5 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo. Posteriormente se agregó 4  $\mu$ L de buffer de reacción, 0.5  $\mu$ L de RiboLock, 2  $\mu$ L de dNTP Mix 10 mM y 1  $\mu$ L de RevertAid H Minus M-MuLV transcriptasa reversa, se mezcló perfectamente y se incubó a 42 °C por 60 minutos. Una vez finalizado el tiempo de incubación se diluyó el cDNA obtenido colocando 5  $\mu$ L de cDNA en 45  $\mu$ L

de agua libre de RNasa teniendo una concentración final de 25 ng/ $\mu$ L. Las muestras se guardaron a -70 °C hasta su uso.

### 7.3.5 Análisis de la expresión de genes por qPCR

Se evaluó la expresión diferencial de *pilA*, *omcB*, *omcS* y GSU1501 en la cepa WT y en las mutantes estudiadas de *G. sulfurreducens*. Para ello, primeramente se realizó la extracción de RNA y la síntesis de cDNA como se mencionó anteriormente. Para la reacción de qPCR se ocuparon 25 ng de cDNA (1 $\mu$ L) de cada una de las muestras y se adicionaron los siguientes componentes a cada tubo de reacción: 10  $\mu$ L de LightCycler 480 Sybr Green I Master Mix (Roche), 2  $\mu$ L de oligos y 7  $\mu$ L de agua libre de RNasa. Se mezcló perfectamente el contenido de cada reacción y posteriormente se transfirieron a una microplaca de 96 pozos. El equipo utilizado fue LightCycler® y el programa que se usó es el siguiente:

			<b>Adquisición</b>
Preincubación	1 ciclo	95 °C por 600 s	Ninguna
PCR	40 ciclos	95 °C por 15 s 60 °C por 60 s	Simple
Melting	1 ciclo	95 °C 1 s	Continúa

## 7.4 Caracterización del biofilm

### 7.4.1 Medición del biofilm por cristal violeta

Debido a que *G. sulfurreducens* es un microorganismo anaerobio forma biofilm en el fondo del tubo de cultivo y por lo tanto se pusieron FTO (vidrios semiconductores de óxido de estaño dopados con flúor) con un tamaño de 1 x 3 cm como soporte al fondo del tubo de cultivo para poder evaluar la estructura del biofilm. Se determinó la cantidad de biofilm producido por cada una de las cepas utilizando la técnica con cristal violeta previamente descrita (Pantanella *et al.*, 2013). Para ello, los FTO fueron colocados en los tubos con medio de cultivo NBAF antes de ser burbujeados y esterilizados. Posteriormente, estos tubos fueron inoculados con 400  $\mu$ L de cultivo en medio NBAF con una  $DO_{600nm}$  de 0.4 e incubados a 25 °C por 36 y 60 horas. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y los FTO fueron recuperados para teñirlos con cristal violeta de la siguiente manera: primeramente se eliminó el medio de cultivo restante con un lavado con PBS 1X, secando el exceso. Posteriormente, con una jeringa de insulina se agregaron 10 gotas de PBS 1X - Metanol 50 % (la solución debe cubrir completamente la superficie del FTO donde se encuentra el biofilm). Se dejó reposar por 2 min y se retiró el exceso. Luego se colocó metanol suficiente para cubrir la superficie del FTO durante 10 minutos asegurándose de que no se seque la muestra, si esto pasaba se

agregó un poco más de metanol, se eliminó el exceso y se secó a 37 °C. Después se agregó cristal violeta (1% cristal violeta en metanol), se dejó reposar por 10 minutos, cuando finalizó el tiempo se retiró el exceso de colorante y se prosiguió a lavar el FTO con agua Mili-Q. Finalmente, se colocó cada FTO en una celda para espectrofotómetro y se adicionó 1 mL de ácido acético, se desprendió el biofilm del FTO, se quitó el FTO de la celda y se midió la absorbancia a 550 nm, utilizando como blanco ácido acético.

### **7.4.2 Análisis de producción y estructura del biofilm por microscopía confocal**

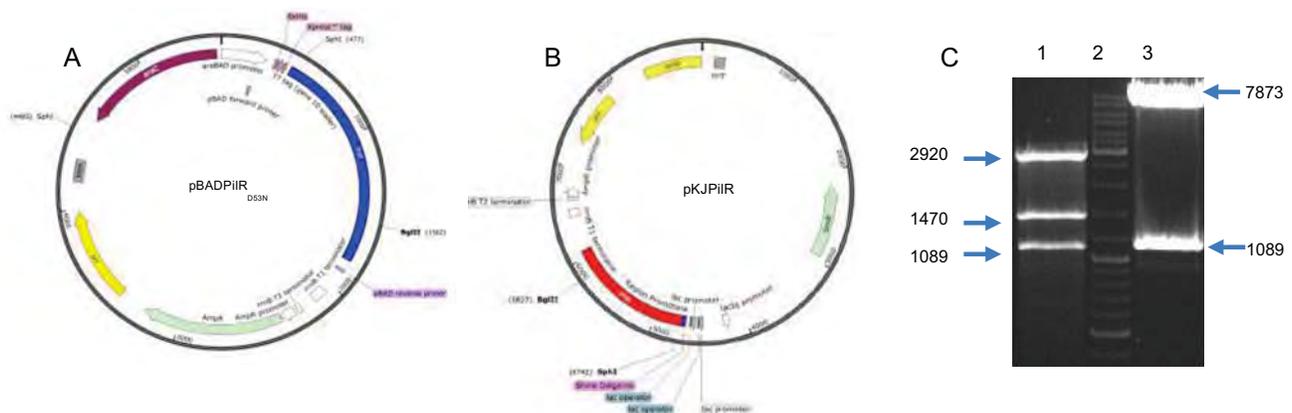
Para evaluar la estructura del biofilm y estimar la viabilidad de las células que lo constituyen se llevo a cabo un análisis por microscopía confocal. Al igual que para la tinción con cristal violeta, se utilizaron FTO como medio de soporte y los cultivos se realizaron como se indicó previamente. Después de recuperar el FTO se prosiguió de la siguiente forma: se eliminó el medio de cultivo restante con un lavado con PBS 1X secando el exceso. Se adicionaron 25 µL de una mezcla de colorantes del kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability (30 µL de Syto 9, 30 µL de yoduro de propidio, 200 µL de solución salina burbujeada y estéril y 200 µL de cisteína 100 mM burbujeada y estéril) y se dejó incubar por 10 minutos, protegiendo la muestra de la luz. Posteriormente, se lavó la muestra con solución salina. Finalmente, se agregaron de 2 o 3 gotas de solución salina con 2 mM de cisteína y se visualizó con el microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico con un aumento de 60X. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con los programas Fiji y Comstat.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Complementación de la mutante deficiente en PilR de *G. sulfurreducens*

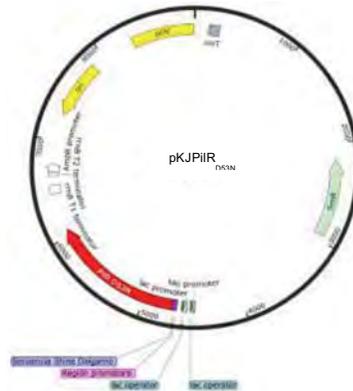
Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar el efecto de una variante no fosforilable de PilR (mutación PilR<sub>D53N</sub>) en *G. sulfurreducens*, ya que previamente se había caracterizado en *E. coli* (Hernández *et al.*, 2017). Para ello, se decidió complementar la mutante deficiente en PilR (PilR-) de *G. sulfurreducens* (Juárez *et al.*, 2009) con el plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub> el cual expresa una variante de PilR que es incapaz de fosforilarse.

El primer paso para llevar a cabo la complementación de la mutante PilR- fue construir el plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub>, el cual se obtuvo subclonando el gen que codifica para PilR<sub>D53N</sub> previamente clonado en el vector pBADHisA (Hernández *et al.*, 2017) en el vector pRG5, el cual es el único vector de expresión hasta ahora descrito para *G. sulfurreducens* (B. Kim *et al.*, 2005). Para lograr este proceso de subclonación, primeramente se realizó una restricción enzimática con SphI y BglII de los plásmidos pBADPilR<sub>D53N</sub> (Hernández *et al.*, 2017) y pKJPilR (Juárez *et al.*, 2009). Posteriormente se purificaron los fragmentos de interés, se ligaron y finalmente se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* para obtener el plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub> (Figura 14).



**Figura 14. Estructura de los plásmidos pBADPilR<sub>D53N</sub> y pKJPilR.** A) Vector pBADHisA con el gen pilR que presenta la mutación puntual D53N. Se muestran los sitios de corte de las enzimas SphI y BglII, que generan bandas de 1089, 1470 y 2920 pb. El fragmento de interés es el de 1089 pb que corresponde a un fragmento del gen pilR con la mutación D53N. B) Vector pRG5 con el gen pilR, se muestran los sitios de corte de las enzimas SphI y BglII, que generan bandas de 1089 y 7873 pb. El fragmento de interés es el de 7873 pb, que corresponde al vector pRG5 y los extremos del gen pilR. C) Restricción enzimática con SphI y BglII de los plásmidos pKJPilR y pBADPilR<sub>D53N</sub>. En el carril 1 se observa la restricción enzimática del plásmido pBADPilR<sub>D53N</sub>, en el carril 2 se muestra el marcador de peso molecular y en carril 3 la restricción enzimática del plásmido pKJPilR.

Una vez que se obtuvo el plásmido pKJPiIR<sub>D53N</sub>, éste fue secuenciado para verificar que tuviera la mutación deseada y que no presentara ningún otro cambio. El plásmido pKJPiIR<sub>D53N</sub> contiene la región promotora de *pilR*, la secuencia Shine-Dalgarno y el gen *pilR* con la mutación D53N clonados en el vector pRG5 (Figura 15).



**Figura 15. Plásmido pKJPiIR<sub>D53N</sub>.** La región promotora, la secuencia Shine Dalgarno y región codificante del gen *pilR* con la mutación D53N fueron ligados al vector pRG5 el cual presenta un gen de resistencia a espectinomicina y un promotor lac.

Los plásmidos pKJPiIR y pKJPiIR<sub>D53N</sub> se utilizaron para expresar las proteínas PiIR y la variante no fosforilable PiIR<sub>D53N</sub> en la mutante PiIR<sup>-</sup> de *G. sulfurreducens*. Para esto, se transformaron células electrocompetentes de la mutante PiIR<sup>-</sup> y las clonas fueron recuperadas en medio NBAF sólido con espectinomicina como marcador de selección después de 15 días de incubación a 30 °C en condiciones anaeróbicas (Figura 16). La mutante PiIR complementada con el plásmido pKJPiIR o pKJPiIR<sub>D53N</sub> fue nombrada como PiIR/pKJPiIR o PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub> respectivamente. Además, también se transformaron células electrocompetentes de la cepa silvestre (WT) de *G. sulfurreducens* con los plásmidos pKJPiIR y pKJPiIR<sub>D53N</sub>, estas cepas fueron nombradas como WT/pKJPiIR y WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, respectivamente. Estas cepas fueron utilizadas para evaluar el efecto de una variante de PiIR incapaz de fosforilarse en *G. sulfurreducens*. Para ello, se estudió el efecto en la reducción de aceptores solubles, en la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia de electrones como la pilina y algunos citocromos y en la formación y estructura del biofilm, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

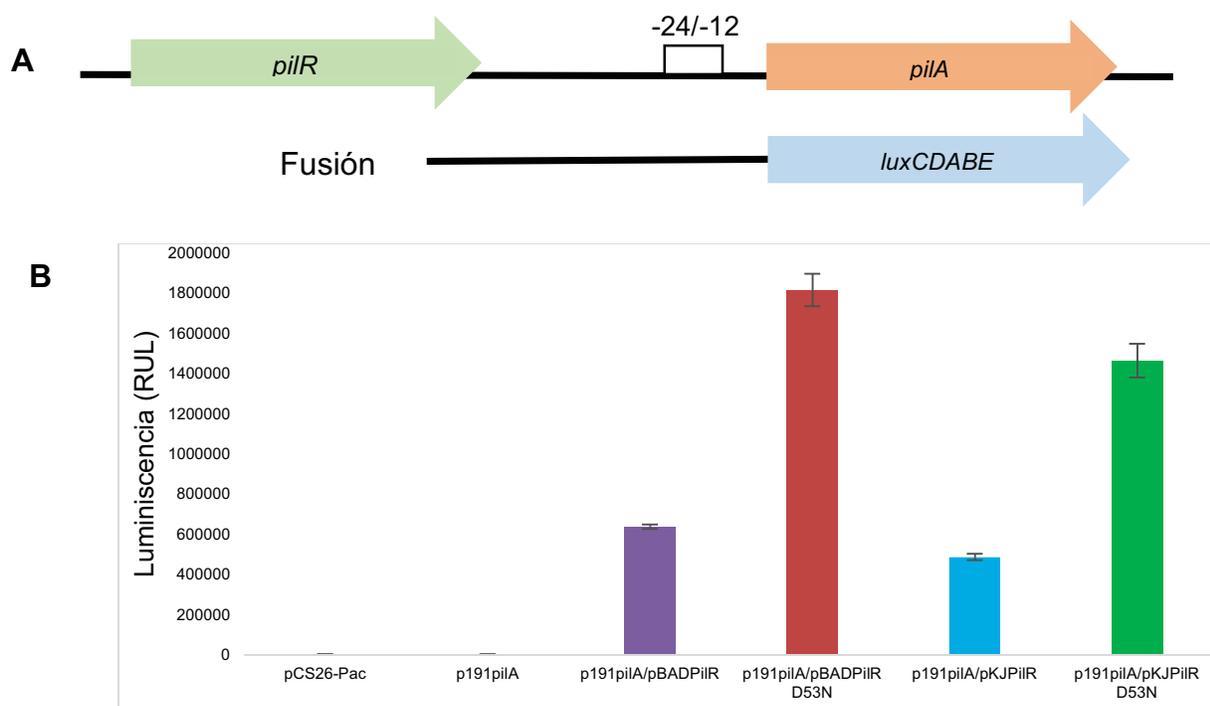


**Figura 16. Aislamiento de clonas de *G. sulfurreducens*.** Botellas con medio NBAF sólido y con condiciones anaeróbicas que permitieron la selección de clonas. Las colonias de *G. sulfurreducens* tienen una coloración rosa debido a la presencia de muchos citocromos.

## 2. Caracterización de la mutante PiIR<sub>D53N</sub> en *G. sulfurreducens*

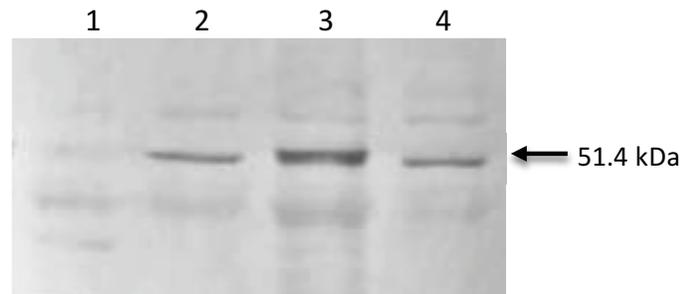
### 2.1 Comprobación de la adecuada expresión y actividad de PiIR<sub>D53N</sub>

Previo a la caracterización de la mutante PiIR<sub>D53N</sub>, se verificó que la proteína se estuviera expresando y que estuviera activa. Para ello, primeramente se evaluó su efecto en la expresión del gen *pilA* utilizando la fusión transcripcional *PpilA::luxCDABE*. Esta fusión está constituida por 191 pb de la región promotora de *pilA* ligada al operón *luxCDABE* del plásmido pCS26-Pac que expresa el gen reportero de luciferasa, este plásmido se nombró p191pilA (Hernández *et al.*, 2017). La activación de la expresión de *pilA* fue medida en un sistema heterólogo por la cuantificación de la producción de luminiscencia en cultivos de *E. coli* en medio LB. Los resultados observados demuestran, en primer lugar, que las proteínas PiIR y PiIR<sub>D53N</sub> se están expresando con el sistema utilizado y en segundo lugar, que son proteínas funcionales que mantienen el mismo fenotipo reportado previamente, es decir que la proteína PiIR<sub>D53N</sub> activa más fuertemente la fusión transcripcional *PpilA::luxCDABE* en comparación con la proteína PiIR silvestre, resultados que ya habían sido previamente observados expresando las proteínas con el plásmido pBAD-HisA (Figura 17) (Hernández *et al.*, 2017).



**Figura 17. Evaluación del efecto de las proteínas PiIR y PiIR<sub>D53N</sub> sobre la activación de la fusión transcripcional *pilA::luxCDABE*.** A) Representación esquemática de la región promotora de *pilA* mostrando el fragmento fusionado al operón *luxCDABE*. B) Efecto de las proteínas PiIR y PiIR<sub>D53N</sub> en la activación de la fusión *pilA::luxCDABE*. Se utilizó como control negativo el plásmido pCS26-Pac y p191pilA, el cual tiene la región promotora de *pilA* ligada al operón *luxCDABE*. La fosforilación de PiIR se lleva a cabo por proteínas histidina cinasa de *E. coli*. Se utilizó como agente inductor 1 % Arabinosa o 1mM IPTG.

Además de comprobar la actividad de las proteínas PilR y PilR<sub>D53N</sub> en el sistema heterólogo, se verificó que estas proteínas se estuvieran expresando en *G. sulfurreducens*. Para ello se realizó un Western Blot o inmunoblot con anticuerpos anti-PilR. Las cepas analizadas fueron WT, PilR-, PilR/pKJPilR y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> y los resultados se observan en la siguiente figura:

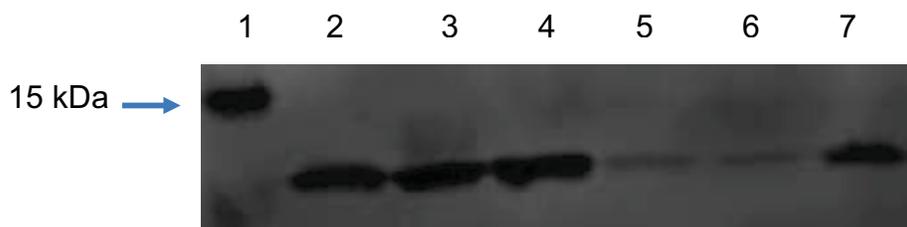


**Figura 18. Inmunodetección de PilR.** La proteína PilR de *G. sulfurreducens* tiene 458 aminoácidos que corresponden a un tamaño de 51.4 kDa. Carril 1. PilR-, Carril 2. PilR/pKJPilR, Carril 3. WT y Carril 4. PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>. Se utilizaron 60  $\mu$ g de proteína de cada una de las muestras.

Como se esperaba, se visualizó una banda correspondiente a la proteína PilR en todas las cepas a excepción de la mutante PilR- (Juárez *et al.*, 2009). La mutante PilR- complementada con los plásmidos pKJPilR y pKJPilR<sub>D53N</sub> restaura la expresión de la proteína PilR pero la cantidad que se observa es menor comparada con la cepa WT. Para determinar que tan disminuida estaba la expresión de la proteína PilR y PilR<sub>D53N</sub> a partir del plásmido pRG5, se realizó un análisis con el programa ImageJ para determinar la intensidad y el área de cada una de las bandas observadas en el Western Blot. Posteriormente se llevó a cabo la normalización de los datos, asignando un valor de 1 para WT, de 0.60 para PilR/pKJPilR y de 0.62 para PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>. Por lo tanto, en la mutante PilR- complementada con cada uno de los plásmidos sólo se tiene aproximadamente la mitad de la cantidad de proteína PilR producida en la cepa WT. Esto puede deberse a que la expresión de la proteína PilR a partir de plásmido no es igual a la expresión a partir de cromosoma. Cabe mencionar que en cromosoma el gen *pilR* forma parte de un operón junto con otros genes necesarios para la biogénesis del pili (*pilB*, *pilT*, *pilC*, *pilS* y *pilR*) y por tanto está sometido a diferentes procesos de regulación. Además, existen varios estudios en los que se ha empleado el plásmido pRG5 para complementar mutantes en las que se deletó algún gen de interés y se observa este mismo efecto, un bajo nivel de expresión de la proteína estudiada (Kim *et al.*, 2005; Kim y Lovley, 2008; Reguera *et al.*, 2005, 2006). Esto podría deberse a varios factores, uno podría ser la carga metabólica, se ha observado que es difícil mantener los plásmidos con resistencia a espectinomicina en medio líquido en *G. sulfurreducens*. Una vez que se comprobó que la proteína PilR<sub>D53N</sub> se expresaba a partir del plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub> en *G. sulfurreducens* se continuó con la caracterización de esta mutante.

## 2.2 Evaluación de la producción de PilA o pilina

Una de las primeras características en evaluar fue la producción de pilina, que como ya se ha mencionado tiene una gran importancia en el proceso de transferencia extracelular de electrones y la formación de biofilm en *G. sulfurreducens*. En estudios previos se observó que la mutación D53N en PilR, la cual genera una variante de PilR incapaz de fosforilarse, favorece la expresión de *pilA* en un sistema heterólogo (Hernández *et al.*, 2017). Por lo tanto, se esperaba que la proteína PilR<sub>D53N</sub> favoreciera la expresión de *pilA* en *G. sulfurreducens*. Para comprobar esto, se analizó la cantidad de pilina producida en las cepas estudiadas y para ello se realizó un Western Blot empleando anticuerpos anti-PilA. Se utilizaron extractos proteicos de las cepas WT, WT/pKJPilR, WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>, PilR-, PilR/pKJPilR y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>, cultivadas en medio NBAF a 25 °C por 36 horas. Los resultados se muestran en la siguiente figura:



**Figura 19. Inmunodetección de PilA.** La proteína PilA o pilina tiene 90 aminoácidos que corresponden a un tamaño de 9.9 kDa. Carril 1. Marcador Page Ruler, Carril 2. WT, Carril 3. WT/pKJPilR. Carril 4. WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>. Carril 5. PilR-. Carril 6. PilR/pKJPilR y Carril 7. PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>. Se utilizaron 20 µg de proteína de cada una de las muestras.

Primeramente, se realizó una análisis con el programa ImageJ para determinar el factor de cambio en la cantidad de pilina comparada con la cepa WT en cada una de las cepas estudiadas. Es importante mencionar que para este análisis se tomaron otras imágenes de Western Blot no mostradas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Factor de cambio en la cantidad de pilina producida	
WT	1
WT/pKJPilR	2.5
WT/pKJPilR <sub>D53N</sub>	1.8
PilR-	0.3
PilR/pKJPilR	0.6
PilR/pKJPilR <sub>D53N</sub>	0.9

Podemos observar que en la mutante PilR- se produce una mínima cantidad de PilA comparada con la cepa WT. Es importante mencionar que, si bien PilR es el regulador principal de la expresión de *pilA*, no es el único, existen estudios en los que se demuestra que otros reguladores globales como IHF (Integration Host Factor), Flp1 y Flp2 (FNR like protein) participan también en su regulación (Hernández *et al.*, 2016). La mutante

PilR- complementada con pKJPilR restablece parcialmente la expresión de *pilA* y la complementación con pKJPilR<sub>D53N</sub> incrementa la producción de PilA más que la proteína PilR, como se había observado en el sistema heterólogo de expresión (Hernández *et al.*, 2017). Sin embargo, en ambos casos la cantidad de pilina es menor a la observada en la cepa WT y esto se debe posiblemente a que la expresión de *pilR* a partir de plásmido es menor o que como se mencionó anteriormente exista cierta carga metabólica que no permita que se alcance la complementación de la mutante PilR al 100%. Este fenotipo ya había sido observado al caracterizar la mutante PilR- y en la complementación de otras mutantes (Juárez *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005; Kim y Lovley, 2008; Reguera *et al.*, 2005, 2006).

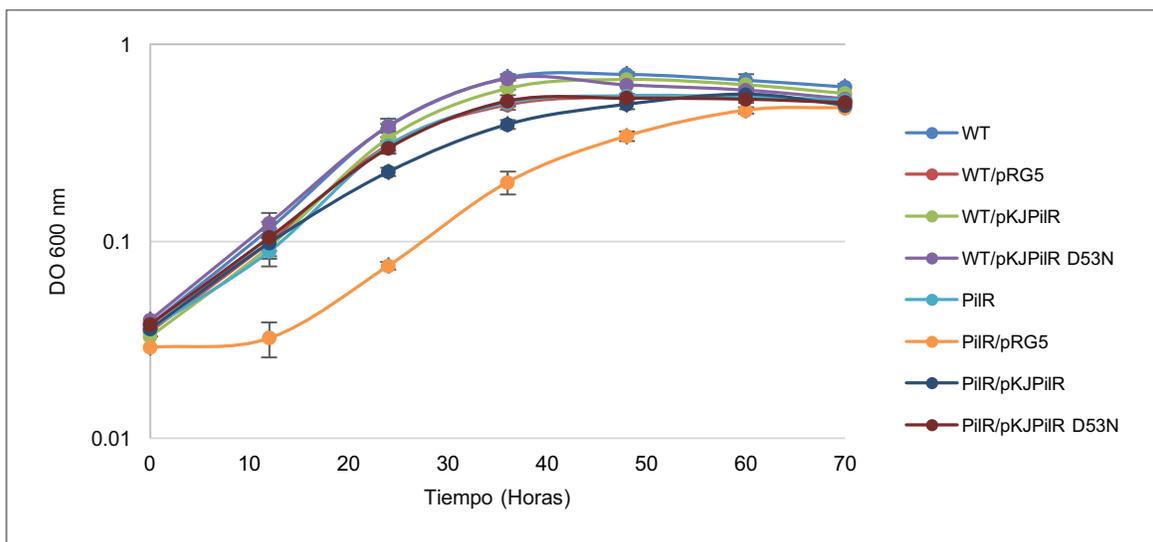
También pudimos observar que las cepas WT/pKJPilR y WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> producen más pilina que la cepa WT (2.5 y 1.8 veces respectivamente). Esto podría deberse a que estas cepas tienen dos copias del gen *pilR*, uno expresado desde el cromosoma y otro expresado desde el plásmido, por lo que hay una mayor cantidad de PilR que esta regulando la expresión de *pilA*. Es importante hacer notar que con base a los experimentos en *E. coli*, se esperaba que la cepa WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> fuera la que más pilina produjera ya que cuenta con una proteína PilR<sub>WT</sub> que puede fosforilarse, lo que permite la expresión de genes regulados por PilR en un estado fosforilado y una proteína PilR<sub>D53N</sub> que no puede fosforilarse, que favorece la expresión de *pilA*. Sin embargo, no es el fenotipo resultante y a nivel de proteína se observa un poco más de pilina en la cepa WT/pKJPilR. Esto podría deberse: a la participación de otros reguladores del gen *pilA*, al efecto que la proteína PilR<sub>D53N</sub> tiene en otros genes involucrados en la producción del pili y al hecho de que se está determinando sólo la cantidad de pilina soluble, que se encuentra en el citosol, pero no estamos considerando la pilina que está formando el pili tipo IV en la membrana externa de la célula (Richter *et al.*, 2012). Por lo que es importante evaluar los procesos fisiológicos en los que el pili participa.

### 2.3 Reducción de aceptores de electrones solubles

El siguiente punto en la caracterización de las cepas estudiadas fue determinar su capacidad para reducir diferentes aceptores de electrones solubles y en este trabajo se evaluó la reducción de fumarato y Fe(III) soluble. Se sabe que en una mutante deficiente en PilR o en PilA la reducción de fumarato no se ve afectada (Juárez *et al.*, 2009; Reguera *et al.*, 2005). Sin embargo, la reducción de Fe(III) soluble si se ve afectada en la mutante deficiente en PilR (Juárez *et al.*, 2009). Es importante mencionar que el pili no es requerido para la reducción de aceptores de electrones solubles pero si para la reducción de aceptores de electrones insolubles como óxidos de Fe(III), óxidos de Mn(IV) y electrodos (Reguera *et al.*, 2005).

### Crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones

Para evaluar la reducción de fumarato se utilizaron cultivos en medio NBAF el cual tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor. El acetato es el principal donador de electrones en los sedimentos donde se encuentra *G. sulfurreducens* y el fumarato es un aceptor de electrones alternativo, utilizado sólo en condiciones de laboratorio, ya que habitualmente no se encuentra como tal en el ambiente (Caccavo *et al.*, 1994). Con cultivos en medio NBAF también se puede monitorear el crecimiento con la medición de la absorbancia a 600 nm, lo que permitió realizar curvas de crecimiento de la cepa WT y las diferentes mutantes estudiadas. Se hizo un análisis estadístico de los datos obtenidos y los resultados se muestran en la siguiente figura:



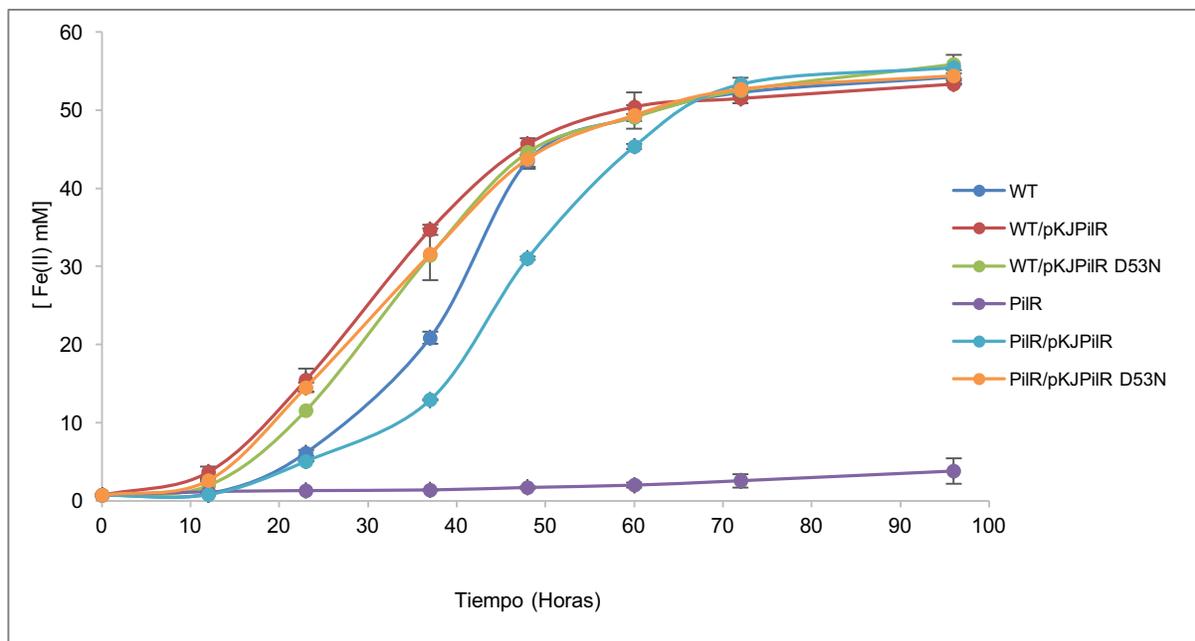
**Figura 20. Curvas de crecimiento en medio NBAF.** Se determinó el crecimiento en medio NBAF de la cepa WT y las mutantes estudiadas midiendo la absorbancia a 600 nm. Los cultivos y las mediciones se realizaron por triplicado.

Como se observa, no hay diferencias significativas al comparar la cepa WT con WT/pRG5, WT/pKJPiIR y WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub> (p valor de 0.08, 0.052 y 0.37, respectivamente). Sin embargo, si hay diferencias al comparar la cepa WT con PiIR, PiIR/pRG5, PiIR/pKJPiIR y PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub> (p valor de 0.018, 0.008, 0.03 y 0.03, respectivamente). Esto puede deberse al efecto generado por la carga metabólica del plásmido pRG5, ya que no hay reportes hasta la fecha de que una mutante en PiIR afecte la expresión de genes involucrados en el metabolismo de fumarato (Juárez *et al.*, 2009). Además, el fumarato es un aceptor de electrones soluble el cual es reducido en la membrana y por lo tanto no requiere de la participación de pili (Butler *et al.*, 2005; Galushko y Schink, 2000). La cepa PiIR/pRG5, la cual es la mutante PiIR- de *G. sulfurreducens* con el plásmido pRG5, presenta un crecimiento más lento comparada

con las otras y esto puede deberse, como ya se mencionó, a un efecto por carga metabólica generada por el plásmido.

### Crecimiento empleando Fe(III) soluble como aceptor de electrones

Para evaluar la reducción de Fe(III) soluble se utilizó el medio citrato férrico, el cual tiene acetato como donador de electrones y Fe(III) soluble como aceptor. A diferencia del fumarato, el Fe(III) esta presente en los sedimentos donde se encuentra *Geobacter* y por tanto, el proceso de transferencia de electrones a este metal es ampliamente estudiado. Se sabe que su reducción se lleva a cabo en la superficie externa de la célula y que en el proceso participan diversos citocromos tipo c. Las cepas analizadas fueron WT, WT/pKJPiIR, WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, PiIR-, PiIR/pKJPiIR y PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub> y los resultados se muestran en la siguiente gráfica:



**Figura 21. Análisis de la reducción de Fe(III) soluble.** El medio citrato férrico tiene acetato como donador de electrones y fumarato como aceptor. Se midió la reducción de Fe(III) por el ensayo de Ferrocina, los cultivos y las mediciones se realizaron por triplicado.

Como observamos, la reducción de Fe(III) soluble si presenta diferencias en las cepas evaluadas. Como se había reportado anteriormente, la reducción de Fe(III) soluble se ve afectada en la mutante PiIR- (Juárez *et al.*, 2009) y es el mismo fenotipo que nosotros observamos. La mutante PiIR- complementada con pKJPiIR restablece la capacidad de reducir Fe(III) soluble pero no a los niveles de la cepa WT y esto puede deberse a que la expresión de proteínas desde plásmido es menor que desde cromosoma, como ya se había mencionado anteriormente. La complementación de PiIR- con pKJPiIR<sub>D53N</sub> restaura mucho mejor la capacidad de reducir Fe(III) soluble, incluso mejor que la cepa WT a pesar de que la cantidad de proteína PiIR sea menor, lo que nos hace pensar que

la variante no fosforilable de PilR puede estar favoreciendo la expresión de genes relacionados con la reducción de Fe(III). Pudimos observar también, que las cepas WT/pKJPilR y WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> reducen Fe(III) soluble más rápido que la cepa WT y no hay diferencia evidente entre ellas, a pesar de que anteriormente se había observado que la cepa WT/pKJPilR produce mayor cantidad de pilina. Esto se debe a que la reducción de Fe(III) soluble no requiere la participación del pili pero si de varios citocromos (Coppi *et al.*, 2007). Por lo tanto, las diferencias encontradas en la reducción de Fe(III) soluble pueden deberse solamente a cambios en la expresión de diferentes citocromos tipo *c*, uno de ellos puede ser OmcB, un citocromo de membrana externa que es esencial para la reducción de Fe(III) soluble e insoluble y cuya expresión se ve disminuida en la mutante PilR- (Juárez *et al.*, 2009; Leang *et al.*, 2003). Por lo tanto, también fue importante evaluar la expresión de otros genes relacionados con el proceso de transferencia de electrones además de la pilina.

#### **2.4 Análisis de la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones**

Hasta ahora, con los resultados obtenidos podemos decir que la variante no fosforilable de PilR (PilR<sub>D53N</sub>) favorece la expresión de *pilA* y de otros genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones. Para comprobar esto, se determinó el nivel de expresión de los genes *omcB*, *omcS*, *pilA* y GSU1501 por qPCR utilizando los primers indicados en la tabla 3 y normalizando los valores con el nivel de expresión de *recA*. Para ello, primeramente se llevo a cabo la extracción de RNA de las cepas WT, WT/pKJPilR, WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>, PilR-, PilR/pKJPilR y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> a partir de cultivos en medio NBAF, incubados a 25 °C por 36 horas. Después de la extracción de RNA, se hizo un tratamiento con DNasa para eliminar el DNA contaminante. Una vez verificada la integridad del RNA, se utilizaron 0.5 µg de RNA tratado para realizar la síntesis de cDNA. Finalmente, se utilizaron 25 ng de cDNA para realizar el experimento de qPCR y los resultados fueron analizados por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Antes de discutir los resultados obtenidos es importante mencionar la función de cada uno de los genes estudiados. En primer lugar, cabe destacar que la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en el proceso de transferencia extracelular de electrones depende del aceptor final, en este trabajo se utilizó fumarato como aceptor final de electrones y se evaluó la expresión de cuatro genes cuyos productos participan directamente en el proceso de transferencia extracelular de electrones. Se evaluaron dos citocromos: OmcB y OmcS, ambos son citocromos de membrana externa que son requeridos para la reducción de Fe(III) (Mehta *et al.*, 2005). Se analizó la expresión de *pilA*, que codifica para la proteína estructural que conforma el pili tipo IV y la expresión del gen GSU1501 que codifica para un transportador tipo ABC y una proteína de unión a ATP, además de que forma parte de un operón de genes que participa en la biosíntesis y exporte de polisacáridos. El gen GSU1501 es importante para el proceso de

transferencia extracelular de electrones, porque la delección de este gen genera una cepa que es deficiente en la aglutinación célula-célula, lo que disminuye la adhesión a electrodos. Además de que presenta una disminución del citocromo OmcZ en la matriz extracelular, recordando que este citocromo es esencial para la transferencia de electrones al electrodo (Rollefson *et al.*, 2011). En segundo lugar, es relevante mencionar los resultados obtenidos en otros estudios en los que determinan el nivel de expresión de los genes analizados en otras condiciones. Mediante un estudio de microarreglos se observó que *omcB*, *pilA* y GSU1501 están sub expresados en la mutante PilR- mientras que *omcS* esta sobre expresado (Juárez *et al.*, 2009), este estudio se realizó a 30 °C utilizando Fe(III) soluble como aceptor de electrones. Además, en otro trabajo se evaluó el nivel de transcrito para *omcS* de la cepa WT de *G. sulfurreducens* con tres diferentes aceptores de electrones: fumarato, Fe(III) soluble y Fe(III) insoluble. Se observó la expresión de *omcS* solamente en dos de las condiciones probadas, fumarato y Fe(III) insoluble; por lo tanto OmcS no es requerido para la reducción de Fe(III) soluble (Mehta *et al.*, 2005). Finalmente, mediante un estudio bioinformático se determinaron los posibles sitios de unión de PilR en el genoma de *G. sulfurreducens* y sólo se encontró un sitio de unión a PilR en la región promotora del gen *pilA* y en la región promotora del operón en el que se encuentra GSU1501, pero no en la región promotora de los otros genes evaluados (Krushkal *et al.*, 2010).

Considerando estos antecedentes, se analizaron y discutieron los resultados obtenidos, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

<b>Tabla 5. Expresión diferencial de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones</b>				
	<i>omcB</i>	<i>omcS</i>	<i>pilA</i>	GSU1501
WT	1	1	1	1
WT/pKJPilR	1.025	28.673	17.108	10.641
WT/pKJPilR <sub>D53N</sub>	0.569	5.689	5.382	3.222
PilR-	0.360	0.538	0.497	0.723
PilR/pKJPilR	0.130	0.456	0.545	0.895
PilR/pKJPilR <sub>D53N</sub>	0.087	6.327	0.780	0.937

Al igual que en los resultados de expresión diferencial reportados para la mutante PilR- por Juárez *et al*; la expresión de los genes *omcB*, *pilA* y GSU1501 está disminuida en esta mutante en nuestras condiciones de cultivo (fumarato como aceptor de electrones a 25 °C). Sin embargo, también hay un aumento en la expresión del gen *omcS*, resultado que es contrastante con los observados en el reporte previo. Este cambio en el nivel de expresión de *omcS* podría deberse al diferente aceptor final de electrones utilizado, fumarato y Fe(III) soluble, ya que como se mencionó anteriormente no se detectan

niveles de transcrito para *omcS* cuando *G. sulfurreducens* es cultivado con Fe(III) soluble como aceptor de electrones, pero si cuando es cultivado en un medio con fumarato como aceptor final de electrones (Mehta *et al.*, 2005). Otro dato que es importante resaltar, es que a pesar de que la expresión de los genes evaluados esté disminuida en la cepa PilR-, hay poca diferencia en las curvas de crecimiento de esta cepa en medio NBAF (fumarato como aceptor de electrones) comparada con la WT. Pero hay cambios importantes en la reducción de Fe(III) soluble. Esto se debe a que los genes evaluados podrían no estar participando directamente en la reducción de fumarato, pero si en la reducción de Fe(III) soluble.

La cepa PilR- complementada con el plásmido pKJPilR debería tener niveles de expresión semejantes a la cepa WT. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la expresión de genes en *trans* en *G. sulfurreducens* no resulta en niveles de proteínas semejantes al de la cepa WT y por lo tanto al no tener la misma cantidad de PilR que en la cepa WT no se observa la misma cantidad de transcrito de los genes estudiados en la cepa PilR/pKJPilR. Los niveles de transcrito para *pilA* y GSU1501 son los que se complementan mejor en la cepa PilR/pKJPilR y esto puede deberse a que en la región promotora de estos genes hay un sitio de unión para PilR que no esta presente en la región promotora de los citocromos OmcB y OmcS (Krushkal *et al.*, 2010), cuyo nivel de transcrito es incluso menor que en la cepa PilR-.

Por otra parte, la cepa PilR- complementada con el plásmido pKJPilR<sub>D53N</sub> favorece más la expresión de GSU1501 y *pilA*, resultado que se complementa con la cantidad de pilina observada en el Western Blot, pero al igual que en la cepa PilR/pKJPilR, la cantidad de PilR<sub>D53N</sub> no es suficiente para alcanzar los niveles de expresión de la cepa WT. Otro de los cambios observados en esta mutante es una disminución en la expresión de *omcB* y un aumento en la expresión de *omcS*, resultados que se discutirán más adelante.

Las cepas WT/pKJPilR y WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> presentan una mayor expresión de la mayoría de los genes evaluados. Al igual que se observó en el Western Blot, la cepa WT/pKJPilR expresa mayor cantidad de pilina que la cepa WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>. Esto podría deberse a que la regulación de *pilA* es un proceso complejo y por lo tanto el efecto de otros reguladores, incluyendo algunos represores, también es importante. Por otra parte, en estudios con *P. aeruginosa* se ha reportado que PilA puede autorregularse, disminuyendo su expresión a concentraciones altas (Kilmury y Burrows, 2016). Un mecanismo similar podría estar pasando en la cepa WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>.

Al igual que *pilA*, la expresión de GSU1501 también es mayor en la cepa WT/pKJPilR, la región promotora del operón al que pertenece este gen tiene un sitio de unión a PilR (Krushkal *et al.*, 2010), pero no hay evidencia experimental de que el operón o GSU1501 este regulado directamente por PilR y si así fuera, cual sería el estado de fosforilación de PilR que favorece la expresión. Nuestros resultados sugieren que PilR fosforilada

favorece la expresión de este gen. El gen que codifica para el citocromo OmcS presenta una mayor expresión en WT/pKJPilR, WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>, este resultado podría deberse a que en estas cepas hay mayor expresión de pilina y dado que OmcS se encuentra decorando el pili de *Geobacter* (Leang *et al.*, 2010), la mayor cantidad de pilina podría inducir de alguna manera una mayor expresión de *omcS*.

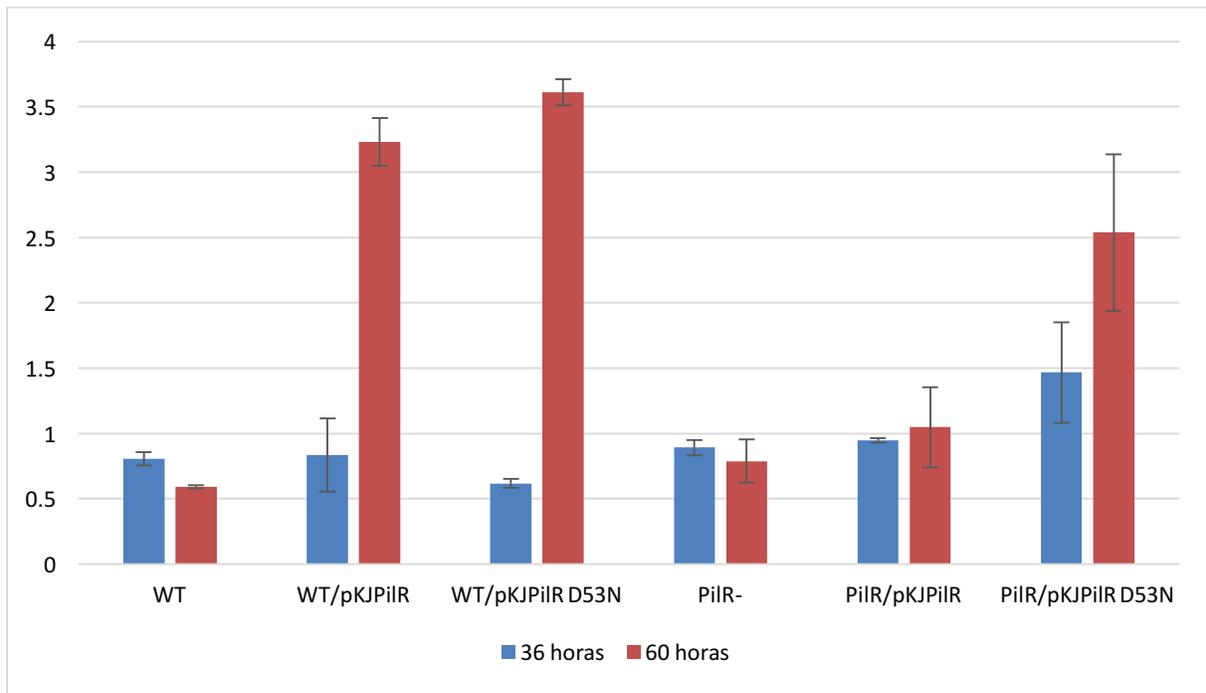
Finalmente, hay una disminución en el nivel de expresión del gen que codifica para el citocromo OmcB en tres cepas: WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>, PilR/pKJPilR y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> y en la cepa WT/pKJPilR el nivel de expresión es casi idéntico al de la cepa WT. Esto puede deberse a que OmcB no es requerido para la reducción de fumarato, ya que en una mutante en la que se deleteo el gen que codifica para OmcB no presenta cambios en la reducción de fumarato (Leang *et al.*, 2003). Además de que *omcB* tiene un promotor dependiente de RpoS (Leang y Lovley, 2005) y por lo tanto no requiere la participación de proteínas tipo EBP como PilR, así que el nivel de expresión observado podría deberse a alguna regulación indirecta de PilR sobre *omcB*.

## 2.5 Caracterización del biofilm de *G. sulfurreducens*

Hasta ahora, en este trabajo se ha evaluado la producción de pilina, la reducción de aceptores de electrones solubles y la expresión de genes relacionados con el proceso de transferencia extracelular de electrones. Pero otra de las estructuras relevantes de *G. sulfurreducens* para la transferencia de electrones es el biofilm de esta bacteria, el cual esta formado principalmente por exopolisacáridos (EPS) y el pili tipo IV. La producción de biofilm es necesaria para la transferencia extracelular de electrones a un ánodo en una MFC con la consecuente generación de electricidad. En estudios previos se ha determinado que una mayor producción de corriente está directamente relacionada con una mayor cantidad de biomasa y una mayor producción de biofilm sobre la superficie del ánodo (Reguera *et al.*, 2006). Por esa razón fue importante evaluar la estructura y la cantidad de biofilm formado por cada una de las cepas estudiadas. Para ello se utilizaron dos técnicas diferentes: la cuantificación por cristal violeta y el análisis por microscopía confocal, en ambas se usó como soporte vidrios semiconductores (FTO). Las cepas analizadas fueron WT, WT/pKJPilR, WT/pKJPilR<sub>D53N</sub>, PilR-, PilR/pKJPilR y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>, las cuales fueron cultivadas en medio NBAF por 36 o 60 horas a 25 °C, condición que ya ha sido reportada que favorece la formación de biofilm (Reguera *et al.*, 2005).

### Estudio del biofilm por cristal violeta

En primer lugar, se realizó la tinción con cristal violeta, esta técnica sirve para realizar un cálculo aproximado de la biomasa que conforma el biofilm (Pantanella *et al.*, 2013) y por lo tanto nos permitió cuantificar el biofilm formado por cada una de las cepas estudiadas en las condiciones probadas, los resultados se muestran en la siguiente figura:



**Figura 22. Caracterización del biofilm por cristal violeta.** Se analizó la producción de biofilm por la cepa WT y las mutantes estudiadas a dos tiempos diferentes. La determinación se hace por espectrofotometría a 550 nm. Las mediciones se realizaron por duplicado y cada valor obtenido fue dividido entre la densidad celular del cultivo.

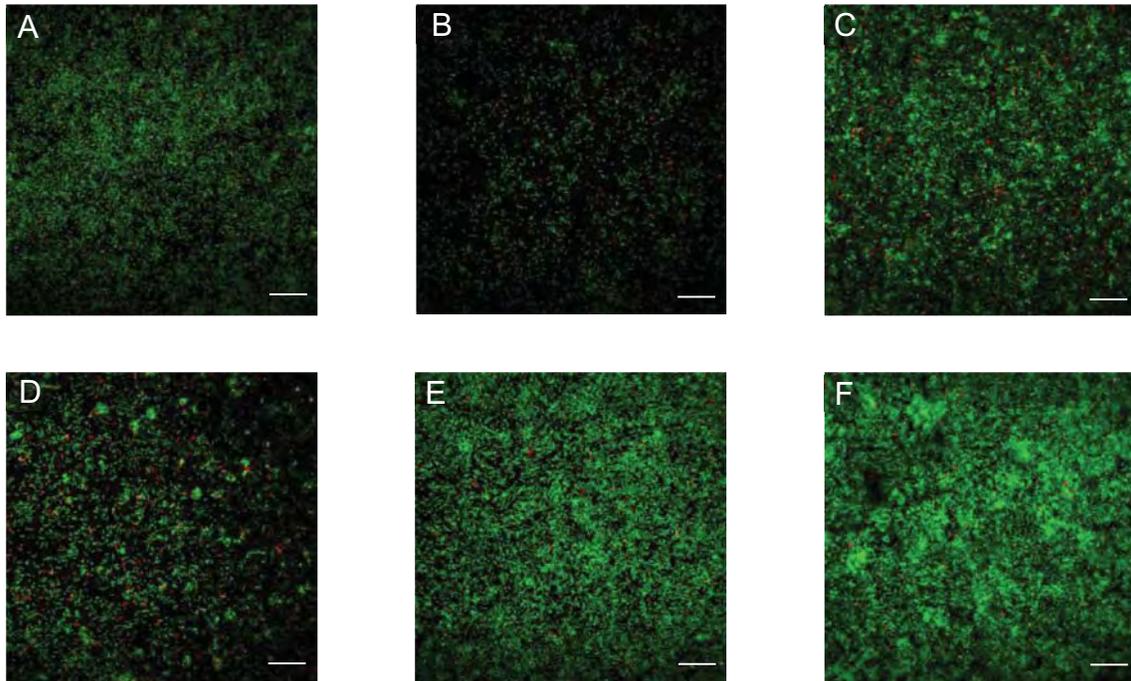
Podemos observar que a las 36 horas de cultivo todas las cepas presentan una cantidad de biofilm muy parecida y esto puede deberse a que en este tiempo de cultivo las células empiezan a adherirse a la superficie del FTO. Por esta misma razón, a un tiempo más largo de cultivo (60 horas) si observamos diferencias. Las cepas que producen mayor cantidad de biofilm son WT/pKJpilR, WT/pKJpilR<sub>D53N</sub> y PilR/pKJpilR<sub>D53N</sub>, las cuales producen 5, 6 y 4 veces más la cantidad producida por la cepa WT. Estas cepas son las que producen mayor cantidad de pilina. Ya se ha reportado en otros microorganismos que el pili favorece la producción de biofilm (Klausen *et al.*, 2003; O'Toole y Kolter, 1998), por lo tanto, la mayor producción de pilina podría estar favoreciendo la producción de biofilm en estas cepas. Además, dado que el biofilm esta compuesto principalmente de exopolisacáridos, el aumento en la expresión de GSU1501 en las cepas WT/pKJpilR y WT/pKJpilR<sub>D53N</sub> podría estar favoreciendo la síntesis de exopolisacáridos, dado que este gen se encuentra dentro de un operón que participa en la síntesis de exopolisacáridos y la delección de GSU1501 genera una mutante que presenta una aglutinación limitada entre célula-célula y disminuye la adherencia a superficies cargadas positivamente (Rollefson *et al.*, 2011).

Se esperaría que la cepa PilR- tuviera menor cantidad de biofilm que la cepa WT, dado que presenta una disminución en la expresión de *pilA* y GSU1501, pero no es el fenotipo que se observa y esto puede deberse al hecho de que la formación de biofilm es un proceso multifactorial en el que intervienen varios reguladores. Es importante destacar que la transferencia de electrones al ánodo de una MFC no solo requiere la presencia de biofilm sobre la superficie del ánodo, sino también de la presencia del pili tipo IV, debido a que el pili es la conexión eléctrica entre la célula y la superficie del electrodo (Reguera *et al.*, 2006). Por lo tanto, a pesar de que la cepa PilR- tenga la misma cantidad de biofilm, este será poco conductivo debido a la poca cantidad de pilina que produce esta cepa.

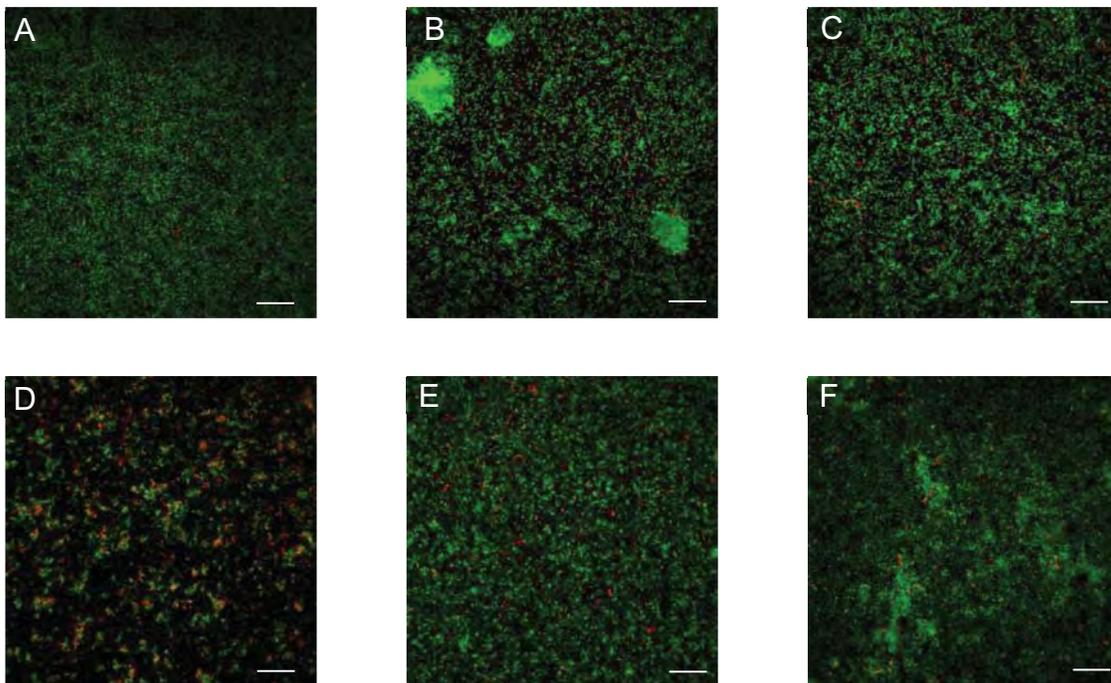
Finalmente, es importante mencionar que la cuantificación del biofilm por cristal violeta no nos permitió distinguir la biomasa correspondiente a las células vivas, ya que este colorante se une a moléculas cargadas negativamente sin distinguir entre células y exopolisacáridos (Pantanella *et al.*, 2013). Por ello, para estimar el porcentaje de células vivas y analizar la estructura del biofilm, se realizó también un análisis por microscopía confocal.

### **Análisis de producción y estructura del biofilm por microscopía confocal**

El ensayo con cristal violeta nos permitió estimar la biomasa del biofilm formado por cada una de las cepas estudiadas, pero para evaluar la estructura y estimar el porcentaje de células vivas se realizó un análisis por microscopía confocal utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability para teñir las células que conforman el biofilm formado sobre la superficie del FTO. Al igual que para el análisis por cristal violeta se analizaron dos tiempos de cultivo, 36 y 60 horas. Todas las imágenes fueron tomadas en el centro del FTO ya que era el punto donde el biofilm era más uniforme, al final se evaluaron cuatro imágenes de cada una de las cepas estudiadas y cada imagen estaba formada por varios “slide” o planos del eje Z dependiendo del grosor del biofilm. Las imágenes obtenidas se muestran a continuación:

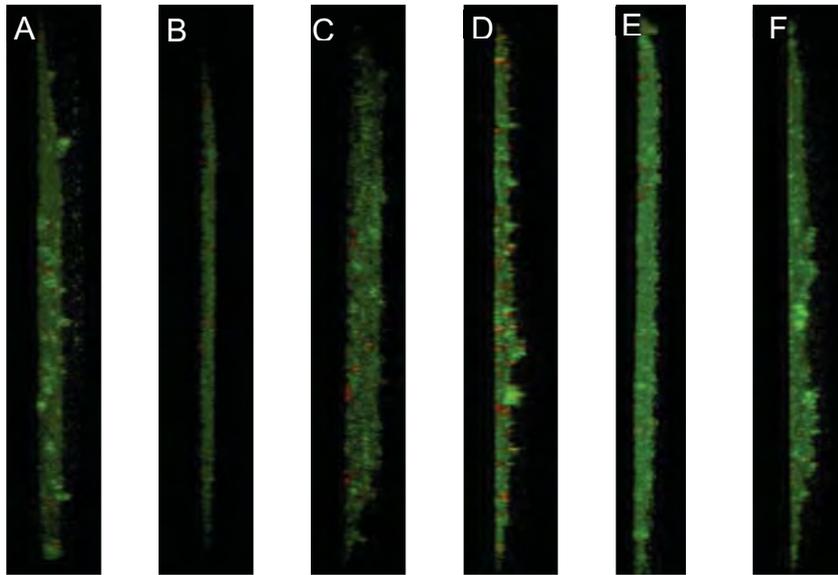


**Figura 23. Imágenes de microscopía confocal a 36 horas de cultivo.** El biofilm fue teñido con el kit LIVE/DEAD®, las células vivas se ven en color verde y las células muertas en rojo, las cepas utilizadas son A) WT, B) WT/pKJPiIR, C) WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, D) PiIR-, E) PiIR/pKJPiIR y F) PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub>. La barras representan 100  $\mu$ m.

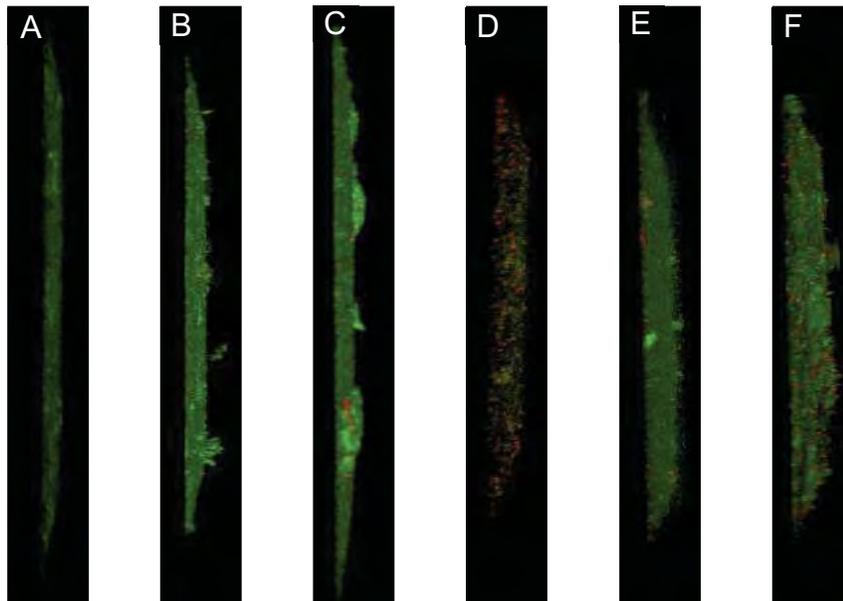


**Figura 24. Imágenes de microscopía confocal a 60 horas de cultivo.** El biofilm fue teñido con el kit LIVE/DEAD®, las células vivas se ven en color verde y las células muertas en rojo, las cepas utilizadas son A) WT, B) WT/pKJPiIR, C) WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, D) PiIR-, E) PiIR/pKJPiIR y F) PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub>. La barras representan 100  $\mu$ m.

Además de las imágenes de un solo plano del eje Z, el programa Fiji se utilizó para obtener una vista lateral del biofilm formado por cada una de las cepas, para esto se utilizó la función “3D viewer”. Es importante mencionar que los “slide” o planos del eje Z utilizados para generar esta vista lateral varían dependiendo del grosor del biofilm. Los resultados se muestran en las siguientes figuras:



**Figura 25. Vista lateral del biofilm a 36 horas de cultivo.** Las imágenes son una vista lateral con un ángulo de  $45^\circ$  reconstruidas a partir de todos los planos en el eje Z colectados por microscopía confocal. Las cepas utilizadas son A) WT, B) WT/pKJPiIR, C) WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, D)PiIR-, E) PiIR/pKJPiIR y F) PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub>. El programa utilizado es Fiji.



**Figura 26. Vista lateral del biofilm a 60 horas de cultivo.** Las imágenes son una vista lateral con un ángulo de  $45^\circ$  reconstruidas a partir de todos los planos en el eje Z colectados por microscopía confocal. Las cepas utilizadas son A) WT, B) WT/pKJPiIR, C) WT/pKJPiIR<sub>D53N</sub>, D)PiIR-, E) PiIR/pKJPiIR y F) PiIR/pKJPiIR<sub>D53N</sub>. El programa utilizado es Fiji.

A partir de las imágenes anteriores podemos ver que hay diferencias estructurales en los biofilms producidos por las diferentes cepas estudiadas y que la estructura varía con el tiempo. Para poder hacer un análisis más completo que nos permita discutir las diferencias observadas se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de células vivas y muertas, grosor, coeficiente de rugosidad y cobertura de sustrato.

Primeramente se determinó el porcentaje de células vivas y muertas en el biofilm, lo que nos permitió estimar el porcentaje de células activas metabólicamente. Esto fue posible debido a que los colorantes del kit LIVE/DEAD® pueden distinguir entre células vivas y muertas debido a la diferencia en la permeabilidad de la membrana de estas células y por tanto, el colorante Syto 9 se une a ácidos nucleicos de bacterias vivas emitiendo una fluorescencia de color verde y el yoduro de propidio se une a ácidos nucleicos de bacterias que presenten daño en la membrana, es decir bacterias muertas y emite una fluorescencia color rojo. Utilizando una mezcla adecuada de estos dos colorantes se pudo visualizar en color verde las bacterias vivas y en color rojo las bacterias muertas. Con el programa Fiji se visualizó cada uno de los canales (rojo y verde) en imágenes distintas y con la función “Find Maxima” de este mismo programa, se pudo realizar un estimado de la cantidad de células vivas y muertas que constituyen el biofilm de cada una de las cepas estudiadas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

<b>Tabla 6. Viabilidad de las células que constituyen el biofilm</b>		
Cepa	% Células vivas 36 horas	% Células vivas 60 horas
WT	74 ± 1.2	79 ± 7.0
WT/pKJPilR	67.5 ± 1.6	67 ± 3.8
WT/pKJPilR <sub>D53N</sub>	74 ± 2	79 ± 2.8
PilR-	68 ± 1.4	60 ± 1.4
PilR/pKJPilR	79.5 ± 4.9	77 ± 1.3
PilR/pKJPilR <sub>D53N</sub>	75 ± 1.4	75.5 ± 2.12

Debido a que *G. sulfurreducens* es un microorganismo anaerobio, muchas células mueren al momento de retirar el FTO del medio de cultivo y exponerlo al oxígeno del aire para realizar la tinción y observarlo al microscopio. Para disminuir esta pérdida, los FTO con el biofilm formado fueron sumergidos en solución salina con cisteína 100 mM como medio reductor. En todas las cepas estudiadas el porcentaje de células vivas es mayor al 60 %, lo que significa que en el biofilm al menos este porcentaje de células se encuentra viable. En la mayoría de las cepas no hay cambios significantes en el porcentaje de células vivas en los dos tiempos estudiados a excepción de PilR-, en la cual hay un aumento de la cantidad de células muertas a las 60 horas de cultivo, este resultado se complementa al observar las imágenes de esta cepa a ese tiempo de cultivo. Este mismo fenotipo se observa en un estudio en el que se analizó la estructura

del biofilm formado por una mutante deficiente en PilA sobre la superficie del ánodo de una MFC, donde el porcentaje de células muertas fue alrededor del 60 % y este porcentaje fue mayor sobre todo en las capas superiores, las cuales no están en contacto directo con la superficie del electrodo (Reguera *et al.*, 2006), por lo que el aumento en las células muertas en la mutante PilR- podría deberse a la disminución de la expresión de *pilA*.

Por otra parte, el cálculo de los otros parámetros se realizó con el programa Comstat, el cual tiene la ventaja de que aplica un procesamiento previo al análisis de imagen el cual consiste de un proceso de umbralización y uno de segmentación, que en conjunto remueven de manera eficiente el ruido de las imágenes obtenidas (Heydorn *et al.*, 2000). Con este programa se determinó el grosor, coeficiente de rugosidad y cobertura de sustrato de las cepas estudiadas a partir de las imágenes obtenidas por microscopia confocal. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 7. Características del biofilm formado por las diferentes cepas de *G. sulfurreducens***

Cepa	Grosor		Coeficiente de rugosidad		% de cobertura del sustrato	
	36 horas (µm)	60 horas (µm)	36 horas	60 horas	36 horas	60 horas
WT	13.53 ± 1.4	9.9 ± 2.8	1.79 ± 0.32	1.09 ± 0.09	24.33 ± 3.02	30.06 ± 0.79
WT/pKJPiIR	5.61 ± 0.46	12.87 ± 2.33	1.36 ± 0.10	1.42 ± 0.21	16.04 ± 4.20	30.54 ± 1.16
WT/pKJPiIRD <sub>53N</sub>	8.25 ± 2.33	12.54 ± 0	1.24 ± 0.07	1.61 ± 0.12	17.89 ± 1.09	26.51 ± 2.60
PiIR	11.88 ± 0	9.9 ± 0	1.78 ± 0.10	1.12 ± 0	13.42 ± 1.18	21.35 ± 3.66
PiIR/pKJPiIR	8.58 ± 0.93	12.21 ± 1.4	1.27 ± 0.05	1.32 ± 0.20	20.80 ± 1.57	29.40 ± 3.60
PiIR/pKJPiIRD <sub>53N</sub>	17.16 ± 3.73	15.18 ± 1.86	1.23 ± 0.06	1.20 ± 0.08	31.76 ± 1.69	35.67 ± 0.15

El primer parámetro considerado fue el grosor del biofilm formado por las diferentes cepas de *G. sulfurreducens*, ya que este parámetro es uno de los más reportados en estudios donde caracterizan el biofilm de otros microorganismos. Como se observa en la tabla, las cepas que tienen un biofilm más grueso a las 36 horas de cultivo son WT, PiIR- y PiIR/pKJPiIRD<sub>53N</sub>, a este tiempo de cultivo el biofilm está empezando a formarse en la superficie del FTO y por tanto no reflejar los cambios en la producción del biofilm esperados con la mutación PiIRD<sub>53N</sub>, como ya se había mencionado anteriormente. A las 60 horas de cultivo, se observa que el grosor de la cepa PiIR- disminuyó y de los cálculos anteriores observamos que el porcentaje de células muertas aumenta. Además de que en esta cepa hay una disminución en la expresión de la pilina, por lo que el biofilm producido por PiIR- probablemente será poco conductivo. Por otra parte, las cepas que presentan un biofilm más grueso a las 60 horas de cultivo son WT/pKJPiIR, WT/pKJPiIRD<sub>53N</sub> y PiIR/pKJPiIRD<sub>53N</sub>, este mismo resultado se obtiene cuando se hace la cuantificación con cristal violeta y como se mencionó anteriormente, esto podría deberse a que estas cepas sobre expresan *pilA* y GSU1501, dos genes que están relacionados con la producción de biofilm. Hasta la fecha no hay reportes del biofilm que produce *G. sulfurreducens* sobre FTO, ya que en la mayoría de los estudios de biofilm se utilizan

electrodos como soporte. En uno de estos estudios reportan que el grosor del biofilm que produce la cepa WT de *G. sulfurreducens* es de 40  $\mu\text{m}$  (Reguera *et al.*, 2006). El mayor grosor que obtuvimos en nuestras condiciones es de 15.18  $\mu\text{m}$  y corresponde a la cepa PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub>, este valor es mucho menor al reportado. Es importante mencionar que el FTO que nosotros utilizamos como soporte no es el aceptor final de electrones, en cambio el electrodo utilizado en otros estudios si lo es. Por lo que sería importante evaluar la producción de biofilm sobre la superficie de algún electrodo para verificar si la mutación D53N en PilR favorece la producción de biofilm sobre otras superficies de interés como el ánodo de una MFC. Nuestros resultados nos indican que las cepas WT/pKJPilR, WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> y PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> probablemente producirían un biofilm bastante conductivo en la superficie del ánodo de una MFC, ya que son las cepas con mayor pilina y mayor biofilm y nos confirman que la variante no fosforilable de PilR (mutación D53N) favorece la producción de pilina y biofilm.

Por otra parte, el coeficiente de rugosidad del biofilm nos habla sobre la homogeneidad del mismo, valores mayores indican menos homogeneidad. Como vemos en las imágenes tridimensionales, los biofilms de las cepas estudiadas no son muy homogéneos ya que tienden a formar aglomerados de células y esta observación se apoya con los datos de la tabla 7, ya que todas las cepas tienen un coeficiente de rugosidad mayor a 1, el cual es bastante alto si lo comparamos con el biofilm que produce una de las bacterias más estudiadas, *P. aeruginosa*, el cual tiene un coeficiente de rugosidad cercano a 0.2 (Heydorn *et al.*, 2000). Esto puede deberse al sustrato que se utilizó, al tiempo de crecimiento y a los cambios generados a la estructura del biofilm por la manipulación durante el proceso de tinción. El coeficiente de rugosidad se mantuvo relativamente constante con el paso del tiempo en la mayoría de las cepas. WT y PilR- forman un biofilm bastante homogéneo; mientras que las cepas WT/pKJPilR y WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> presentan un coeficiente de rugosidad mayor. Estas cepas tienden a formar aglomerados de células como los que se observan en la figura 24 y estos aglomerados originan que el grosor del biofilm en estas cepas también sea mayor. El biofilm más denso es el formado por la cepa PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> ya que es el más grueso, uno de los más uniformes y el que presenta mayor cobertura de sustrato. Además de que sobre expresa la proteína PilA. Por lo tanto, el biofilm de esta cepa sería bastante conductivo y esta capacidad se vería favorecida con un aumento en la expresión de citocromos tipo c, principalmente OmcZ.

Finalmente, otro de los parámetros analizados fue la cobertura de sustrato, esta característica hace referencia al área cubierta del soporte o sustrato por biomasa del biofilm y nos indica que tan eficientemente el sustrato utilizado es colonizado por el microorganismo estudiado. Como observamos en la tabla 7, el porcentaje de cobertura de sustrato no es muy alto, en la mayoría de las cepas es de aproximadamente 30 % y este valor tiende a aumentar con el tiempo, ya que en todas las cepas el porcentaje fue mayor en los biofilms analizados a las 60 horas de cultivo, lo que sugiere que este valor

podría aumentar si aumentamos el tiempo de cultivo de las cepas estudiadas. En la literatura, esta reportado un valor de 60 % de cobertura de sustrato para la cepa WT sobre la superficie de un electrodo de una MFC (Richter et al., 2012). Por lo que sería importante evaluar la cobertura de sustrato de las mutantes estudiadas sobre la superficie del electrodo, por que una mayor cobertura genera mayor transferencia de electrones.

Tomando en cuenta todas las características evaluadas, observamos que la mutación D53N en PilR, que genera una variante no fosforilable, favorece la expresión de la pilina y de otros genes involucrados en el proceso de transferencia de electrones como *omcS* y GSU1501. Además aumenta la capacidad de reducir Fe(III) soluble y favorece la producción de un biofilm más grueso y homogéneo, el cual se espera que sea más conductivo y por lo tanto favorezca el proceso de transferencia de electrones al ánodo de una MFC. Por otra parte, el hecho de que la cepa WT/pKJPilR produzca más pilina que la cepa WT/pKJPilR<sub>D53N</sub> podría deberse al efecto de otros reguladores. A pesar de que PilR sea el regulador principal de la expresión de *pilA*, el efecto de reguladores como Flp1, Flp2 y las subunidades de IHF también son importantes. Además, los cambios en la expresión de *omcB* y *omcS* nos indican que PilR podría participar en la regulación de estos genes a pesar de que no se hayan encontrado sitios de unión a PilR mediante estudios bioinformáticos. Finalmente, es importante recordar que el proceso de transferencia extracelular de electrones es altamente complejo y por lo tanto esta sometido a varios pasos de regulación y este trabajo permitió conocer un poco más de estos procesos regulatorios que se llevan a cabo en *G. sulfurreducens*.

## X. CONCLUSIONES

La expresión de una variante no fosforilable de PilR (PilR<sub>D53N</sub>), expresada en la mutante deficiente en PilR de *G. sulfurreducens* favorece la expresión de *pilA*. Además, PilR<sub>D53N</sub> favorece la expresión de genes importantes para el proceso de transferencia de electrones como el citocromo tipo *c* OmcS, lo cual fue corroborado por ensayos de RT qPCR.

Las cepas estudiadas no presentan diferencias importantes en el crecimiento empleando fumarato como aceptor de electrones.

En la mutante deficiente en PilR se ve disminuida su capacidad para reducir Fe(III) soluble como aceptor de electrones, como ya se había reportado y este hecho se revierte al complementarla con el plásmido pKJPilR. Al complementar con pKJPilR<sub>D53N</sub>, la reducción es mas eficiente, incluso al compararla con la cepa WT.

PilR<sub>D53N</sub> favorece la formación de biofilm, hecho que puede atribuirse a la sobreexpresión de *pilA* y GSU1501 (genes involucrados en la formación de biofilm), siendo la cepa PilR/pKJPilR<sub>D53N</sub> la que formó el biofilm más grueso y homogéneo de las cepas evaluadas.

## **XI. PERSPECTIVAS**

Evaluar el efecto de la mutación D53N en PilR en la capacidad para reducir aceptores de electrones insolubles como óxidos de Fe(III).

Evaluar por microscopia electrónica el número y la estructura del pili tipo IV en la superficie de la membrana externa de las cepas estudiadas de *G. sulfurreducens*.

Probar la capacidad de transferencia de carga de las cepas estudiadas en celdas microbianas de combustible.

Insertar la mutación puntual D53N en el cromosoma de *G. sulfurreducens* para evadir el efecto generado por carga metabólica al utilizar el plásmido pRG5 como sistema de expresión.

Evaluar el efecto que genera una variante que mimetice el estado fosforilado de PilR en *G. sulfurreducens*

## XII. ANEXOS

### Composición de NB Minerales

Componente	Cantidad
H <sub>2</sub> O Mili-Q	800 mL
NTA (Ácido nitrilotriacético)	2.14 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.1 g
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.3 g
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.17 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.03 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 12H <sub>2</sub> O	0.005 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.005 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.09 g
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.11 g
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.02 g

1. Agregar 800 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q en un vaso de precipitados
2. Añadir el NTA
3. Ajustar el pH entre 8 y 8.5 con NaOH para disolver completamente el NTA
4. Adicionar el resto de los componentes, uno a la vez permitiendo que se disuelva completamente antes de agregar el siguiente
5. Aforar a 1000 mL utilizando H<sub>2</sub>O Mili-Q
6. Almacenar a 4 °C

**Composición de 100X NB Sales**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O Mili-Q	800 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobásico)	42 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (dibásico)	22 g
NH <sub>4</sub> Cl	20 g
KCl	38 g
NaCl	36 g

1. Agregar 800 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q en un vaso de precipitados.
2. Agregar el resto de los ingredientes.
3. Mezclar perfectamente utilizando un agitador magnético.
4. Aforar a 1000 mL utilizando H<sub>2</sub>O Mili-Q.
5. Guardar a 4 °C.

**Composición DL vitaminas**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O Mili-Q	800 mL
Biotina	0.0002 g
Ácido pantoténico	0.005 g
B-12	0.0001
Ácido p-aminobenzóico	0.005 g
Ácido tióctico	0.005 g
Ácido nicotínico	0.005 g
Tiamina	0.005 g
Riboflavina	0.005 g
Clorhidrato de piridoxina	0.01 g
Ácido fólico	0.002 g

1. Agregar 800 mL de H<sub>2</sub>O Mili-Q en un vaso de precipitados.
2. Agregar el resto de los ingredientes.
3. Mezclar perfectamente utilizando un agitador magnético.
4. Aforar a 1000 mL utilizando H<sub>2</sub>O Mili-Q.
5. Guardar a 4 °C.

## XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, R.T., Vrionis, H.A., Ortiz-Bernad, I., Resch, C. T., Long, P. E., Dayvault, R., Karp, K., Marutzky, S., Metzler, D. R., Peacock, A., White, D. C., Lowe, M., & Lovley, D. (2003). Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of uranium-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5884-5891. doi: 10.1128/AEM.69.10.5884-5891.2003
2. Bjarnason, J., Southward, C. M., & Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4973-4982. doi.org/10.1128/JB.185.16.4973
3. Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1548-1555. doi.org/10.1128/AEM.69.3.1548
4. Bretl, D. J., Müller, S., Ladd, M. K., Atkinson, S. N., & Kirby, J. R. (2016). Type IV-pili dependent motility is co-regulated by PilSR and PilS2R2 two-component systems via distinct pathways in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology*, 102(1), 37-53. doi:10.1111/mmi.13445
5. Buck, M., & Cannon, W. (1992). Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature*, 358(6385), 422-422. doi.org/10.1038/358422a0
6. Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 493-520. doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055
7. Butler, J. E., Kaufmann, F., Coppi, M. V, Núñez, C., & Lovley, D. R. (2004). MacA, a diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 4042-4045. doi.org/10.1128/JB.186.12.4042
8. Butler, J. E., Glaven, R.H., Esteve-Núñez, A., Núñez, C., Shelobolina, E. S., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2005). Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction and succinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and engineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens*. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 450 - 455. doi: 10.1128/JB.188.2.450-455.2006
9. Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F., & McInerney, M. J. (1994). *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3752-3759. doi.org/0099-2240/\$04.00+0
10. Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 325-347. doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039
11. Carrick, C. S., Fyfe, J. A., & Davies, J. K. (2000). The genome of *Neisseria gonorrhoeae* retains the remnants of a two-component regulatory system that once controlled piliation. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2), 197-201. doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00145-2
12. Casadaban, M. J., Chou, J., & Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and in vitro gene fusions that join an enzymatically active,  $\beta$ -galactosidase

- segment to amino-terminal fragments of exogen. *Journal of bacteriology*, 143(2), 971–980.
13. Chan, C. H., Levar, C. E., Zacharoff, L., Badalamenti, J. P., & Bond, D. R. (2015). Scarless genome editing and stable inducible expression vectors for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7178–7186. doi.org/10.1128/AEM.01967-15
  14. Coppi, M. V., O’Neil, R. A., Leang, C., Kaufmann, F., Methé, B. A., Nevin, K. P., Woodard, T. L., Liu, A., & Lovley, D. R. (2007). Involvement of *Geobacter sulfurreducens* SfrAB in acetate metabolism rather than intracellular, respiration-linked Fe(III) citrate reduction. *Microbiology*, 153(10), 3572–3585. doi.org/10.1099/mic.0.2007/006478-0
  15. Coppi, M. V., Leang, C., Sandler, S. J., & Lovley, D. R. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3180–3187. doi.org/10.1128/AEM.67.7.3180
  16. Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. (2004). *Nature Reviews Microbiology*, 2, 363 - 378. doi:10.1038/nrmicro885
  17. Craig, L., & Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(2), 267–277. doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.009
  18. Dorman, C. J. (2009). Chapter 2 Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 67). Elsevier Inc. doi.org/10.1016/S0065-2164(08)01002-2
  19. Fiévet, A., Cascales, E., Valette, O., Dolla, A., & Aubert, C. (2014). IHF is required for the transcriptional regulation of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough *orp* operons. *Plos one*, 9(1), 1–9. doi.org/10.1371/journal.pone.0086507
  20. Galperin, M. Y., & Nikolskaya, A. N. (2007). Identification of sensory and signal-transducing domains in Two-Component Signaling Systems. *Methods enzymol*, 344, 47–74. doi.org/10.1016/S0076-6879(06)22003-2
  21. Galushko, A. S., & Schink, B. (2000). Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Archives of Microbiology*, 174(5), 314–321. doi.org/10.1007/s002030000208
  22. Gao, R., & Stock, A. (2009). Biological insights from structures of Two Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, 133–154. doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214.Biological
  23. Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV pilin proteins: Versatile molecular modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740–772. doi.org/10.1128/MMBR.00035-12
  24. Hamoen, L. W., Van Werkhoven, a F., Venema, G., & Dubnau, D. (2000). The pleiotropic response regulator DegU functions as a priming protein in competence development in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9246–9251. doi.org/10.1073/pnas.160010597
  25. Hernández, E. A., Andrade, Á., Olvera, M., Burgos, X. & Juárez, K. (2016). Chapter 1.2. Producción de bioelectricidad en *Geobacter sulfurreducens* a través de la biosíntesis del pili. In: Candal, R., Curutchet, G., Domínguez-Montero, L., Macarie, H., Poggi-Varaldo, H., Vázquez, S. and Sastre, I. (Editors): *Environmental Biotechnology and Engineering: ISEBE Advances 2016*, pages 15-26. Ed. Cinvestav, Mexico City, Mexico.
  26. Hernández, E. A., Andrade, Á., Soto, L., Morett, E., & Juárez, K. (2017). The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates *pilA* gene expression

- in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(33), 25693–25701. doi.org/10.1007/s11356-016-6192-5
27. Heydorn, A., Nielsen, A. T., & Hentzer, M. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(146), 2395–2407. doi.org/10.1016/j.visres.2010.03.008
  28. Hobbs, M., Collie, E. S. R., Free, P. D., Livingston, S. P., & Mattick, J. S. (1993). PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type-4 Fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 7, 669–682. doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01158.x
  29. Holmes, D. E., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1591–1599. doi.org/10.1099/ijs.0.02958-0
  30. Inoue, K., Qian, X., Morgado, L., Kim, B. C., Mester, T., Izallalen, M., Salgueiro, C. A., & Lovley, D. R. (2010). Purification and characterization of OmcZ, an outer-surface, octaheme c-type cytochrome essential for optimal current production by *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3999–4007. doi.org/10.1128/AEM.00027-10
  31. Ishimoto, K. S., & Lory, S. (1989). Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6), 1954–1957. doi.org/10.1073/pnas.86.6.1954
  32. Jin, T., & Inouye, M. (1993). Ligand binding to the receptor domain regulates the ratio of kinase to phosphatase activities of the signaling domain of the hybrid *Escherichia coli* transmembrane receptor, Taz1. *Journal of Molecular Biology*, 232(2), 484–492. doi.org/10.1006/jmbi.1993.1404
  33. Juárez, K., Kim, B.-C., Nevin, K., Olvera, L., Reguera, G., Lovley, D. R., & Methé, B. A. (2009). PilR, a Transcriptional regulator for pilin and other genes required for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(3–4), 146–158. doi.org/10.1159/000115849
  34. Karlin, S., Brocchieri, L., Mrázek, J., & Kaiser, D. (2006). Distinguishing features of delta-proteobacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11352–11357. doi.org/10.1073/pnas.0604311103
  35. Kehl-Fie, T. E., Porsch, E. A., Miller, S. E., & St. Geme, J. W. (2009). Expression of *Kingella kingae* type IV pili is regulated by  $\sigma^{54}$ , PilS, and PilR. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4976–4986. doi.org/10.1128/JB.00123-09
  36. Kilmury, L. N. & Burrows L. L. (2016). Type IV pilins regulate their own expression via direct intramembrane interactions with the sensor kinase PilS. *PNAS*, 113(21), 6017–22. doi: 10.1073/pnas.1512947113. Epub
  37. Kim, B. C., & Lovley, D. R. (2008). Investigation of direct vs. indirect involvement of the c-type cytochrome MacA in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiology Letters*, 286(1), 39–44. doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01252.x
  38. Kim, B., Leang, C., Ding, Y. R., Glaven, R. H., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2005). OmcF, a putative c-type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of other outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of bacteriology*, 187(13), 4505–4513. doi.org/10.1128/JB.187.13.4505
  39. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., &

- Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511–1524. doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x
40. Krushkal, J., Juárez, K., Barbe, J. F., Qu, Y., Andrade, A., Puljic, M., Adkins, R. M., Lovley, D. R., & Ueki, T. (2010). Genome-wide survey for PilR recognition sites of the metal-reducing prokaryote *Geobacter sulfurreducens*. *Gene*, 469(1–2), 31–44. doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.005
41. Leang, C., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2003). OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology*, 185(7), 2096–2103. doi: 10.1128/JB.185.7.2096-2103.2003
42. Leang, C., & Lovley, D. R. (2005). Regulation of two highly similar genes, *omcB* and *omcC*, in a 10 kb chromosomal duplication in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology*, 151(6), 1761–1767. doi.org/10.1099/mic.0.27870-0
43. Leang, C., Qian, X., Mester, T., & Lovley, D. R. (2010). Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 4080–4084. doi.org/10.1128/AEM.00023-10
44. Lloyd, J. R., Leang, C., Myerson, A. L. H., Coppi, M. V., Cuifo, S., Methe, B., Sandler, S. J., & Lovley, D. R. (2003). Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochemical Journal*, 369(1), 153–161. doi.org/10.1042/bj20020597
45. Lovley, D. (1997). Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(97), 305–313. doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00316.x
46. Lovley, D. R. (2006). Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 327–332. doi.org/10.1016/j.copbio.2006.04.006
47. Lovley, D. R. (2008). Extracellular electron transfer: Wires, capacitors, iron lungs, and more. *Geobiology*, 6(3), 225–231. doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00148.x
48. Lovley, D. R. (2011). Reach out and touch someone: Potential impact of DIET (direct interspecies energy transfer) on anaerobic biogeochemistry, bioremediation, and bioenergy. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(2), 101–105. doi.org/10.1007/s11157-011-9236-9
49. Lovley, D. R., Giovannoni, S. J., White, D. C., Champine, J. E., Phillips, E. J. P., Gorby, Y. A., & Goodwin, S. (1993). *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology*, 159(4), 336–344. doi.org/10.1007/BF00290916
50. Lukat, G. S., Lee, B. H., Mottonen, J. M., Stock, A. M., & Stock, J. B. (1991). Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8348–8354.
51. Ma, S., Selvaraj, U., Ohman, D. E., Quarless, R., Hassett, D. J., & Wozniak, D. J. (1998). Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 956–968.
52. Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B. C., Inoue, K., Mester, T., Covalla, S. F., Johnson, J. P., Rotello, V. M., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nature*

- Nanotechnology*, 6(9), 573–579. doi.org/10.1038/nano.2011.119
53. Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314. doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938
54. McCleary, W. R., Stock, J. B., & Ninfa, A. J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *Microbiology*, 175(10), 2793–2798.
55. Mehta, T., Coppi, M. V., Childers, S. E., & Lovley, D. R. (2005). Outer Membrane *c*-type Cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8634–8641. doi.org/10.1128/AEM.71.12.8634
56. Methé, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Madapu, R., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Haft, D. H., Selengut, J., Davidsen, T. M., Zafar, N., White, O., Tran, B., Romero, C., Forberger, H. A., Weidman, J., Khouri, H., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Van Aken, S. E., Lovley, D. R. & Fraser, C. M. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: Metal reduction in subsurface environments. *Science*, 302(5652), 1967–1969. doi.org/10.1126/science.1088727
57. Mitrophanov, A. Y. A., & Groisman, E. E. a. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development*, 22(19), 2601–2611. doi.org/10.1101/gad.1700308.response
58. Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2002). Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiology Journal*, 19(2), 141–159. doi.org/10.1080/01490450252864253
59. Nudleman, E., & Kaiser, D. (2004). Pulling together with type IV pili. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(1–2), 52–62. doi.org/10.1159/000077869
60. O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304. doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x
61. Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*, 25(1), 31–42. doi.org/10.7416/ai.2013.1904
62. Reardon, P. N., & Mueller, K. T. (2013). Structure of the type IVa major pilin from the electrically conductive bacterial nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41), 29260–29266. doi.org/10.1074/jbc.M113.498527
63. Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098–1101. doi.org/10.1038/nature03661
64. Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7345–7348. doi.org/10.1128/AEM.01444-06
65. Reitzer, L., & Schneider, B. L. (2001). Metabolic context and possible physiological themes of sigma54-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol R*, 65(3), 422–444. doi.org/10.1128/MMBR.65.3.422
66. Richter, L. V., Sandler, S. J., & Weis, R. M. (2012). Two isoforms of *Geobacter sulfurreducens* PilA have distinct roles in pilus biogenesis, cytochrome localization,

- extracellular electron transfer, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2551–2563. doi.org/10.1128/JB.06366-11
67. Rollefson, J. B., Stephen, C. S., Tien, M., & Bond, D. R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1023–1033. doi.org/10.1128/JB.01092-10
68. Rotaru, A.E., Woodard, T. L., Nevin, K. P & Lovley, D. (2015). Link between capacity for current production and syntrophic growth in *Geobacter* species. *Frontiers in Microbiology*. 6:(744). doi: 10.3389/fmicb.2015.00744
69. Samuel S., W., & Kaiser, D. (1997). Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7748–7758.
70. Santos, T. C., Silva, M. A., Morgado, L. Dantas, J. M., & Salgueiro, C. A. (2015). Diving into the redox properties of *Geobacter sulfurreducens*: a model for extracellular electron transfer. *Dalton transactions: an international journal of inorganic chemistry*, 44(20), 9335-9344. doi: 10.1039/c5dt00556f
71. Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., Yu, H. Q., & Fredrickson, J. K. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), 651–662. doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93
72. Shimane, K., & Ogura, M. (2004). Mutational analysis of the helix-turn-helix region of *Bacillus subtilis* response regulator DegU, and identification of cis-acting sequences for DegU in the *aprE* and *comK* promoters. *Journal of Biochemistry*, 136(3), 387–397. doi.org/10.1093/jb/mvh127
73. Snoeyenbos-West, O. L., Nevin, K. P., Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (2000). Enrichment of *Geobacter* species in response to stimulation of Fe(III) reduction in sandy aquifer sediments. *Microbial Ecology*, 39(2), 153–167. doi.org/10.1007/s002480000018
74. Studholme, D. J., & Dixon, R. (2004). In silico analysis of the  $\sigma_{54}$ -dependent enhancer-binding proteins in *Pirellula* species strain 1. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 215–225. doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00897-8
75. Swinger, K. K., & Rice, P. A. (2004). IHF and HU: Flexible architects of bent DNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 14(1), 28–35. doi.org/10.1016/j.sbi.2003.12.003
76. Vargas, M., Malvankar, N. S., Tremblay, P., Leang, C., Smith, J. A., Patel, P., Synoeyenbos-West, O., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2013). Aromatic amino acids required for Pili conductivity and long-range extracellular electron transport in *Geobacter sulfurreducens*. *mBio*, 4(2), 1–6. doi.org/10.1128/mBio.00105-13.
77. White, G. F., Edwards, M. J., Gomez-Perez, L., Richardson, D. J., Butt, J. N., & Clarke, T. A. (2016). Mechanisms of bacterial extracellular electron exchange. *Advances in microbial physiology*, 68, 87 - 138. doi: 10.1016/bs.ampbs.2016.02.002
78. Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P. C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., & Buck, M. (2008). Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the  $\sigma_{54}$  promoter-specificity factor. *Molecular Microbiology*, 68(3), 538–546. doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06181.x
79. Zakikhany, K., Harrington, C. R., Nimtz, M., Hinton, J. C. D., & Römling, U. (2010). Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 77(3), 771–786. doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07247.x