



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del regulón GSU1771 de *Geobacter sulfurreducens* en condiciones de formación de biopelícula

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Bernardo Jaramillo Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Katy Juárez López
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Elda Guadalupe Espín
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
Dr. David Romero Camarena
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)
Dr. José Alberto Hernández Eligio
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez
Presidente

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López
Vocal

Dra. Nathalie Roberte Chantal Cabirol
Vocal

Dr. Maximino Aldana González
Vocal

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
Secretario

Agradecimientos

A mis tutores:

- A la Dra. Katy Juárez López por darme la oportunidad de entrar al grupo de trabajo y darme la confianza de realizar este proyecto donde aprendí cosas nuevas y pude reforzar conocimientos y habilidades. También por poner la salud de todo el grupo sobre todas las cosas durante la pandemia.
- Al Dr. José Alberto Hernández Eligio por su paciencia y todas sus enseñanzas teóricas y prácticas durante la realización del proyecto. Por siempre estar disponible para resolver dudas o platicar sobre cualquier problema dentro y fuera del laboratorio y hacer el ambiente de trabajo muy ameno.
- A la Dra. Elda Guadalupe Espín y el Dr. David Romero Camarena, miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones al proyecto, sus observaciones y consejos durante los exámenes tutorales.
- A la Dra. Leticia Vega Alvarado por su apoyo los análisis bioinformáticos.
- la Ing. Leticia Olvera Rodríguez por estar siempre estar dispuesta a ayudar en temas de biología molecular.
- Al Dr. Derek R. Lovley por proporcionar los anticuerpos para detectar OmcS y OmcZ.
- Al Biol. Felipe Olvera Rodríguez por su soporte técnico.
- A la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- A mis compañeros que estuvieron en el grupo de trabajo que durante los momentos más difíciles de la pandemia y durante el regreso a actividades ya sea de forma virtual o presencial: Paloma, Alan, Karen, Fanny, Adrián, Manuel, Nayely y Luis.
- A mis compañeros de la maestría por ser apoyo moral y emocional durante el posgrado además de estar dispuestos a ayudarnos en lo que necesitemos dentro y fuera del instituto: Angie, César, Indra, Manuel, Mike, Samuel y Raziel.
- Al proyecto PAPIIT-UNAM No. IN210017
- Al CONACyT por la beca de manutención.

Contenido

Lista de figuras	III
Lista de tablas	IV
Resumen	V
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico	2
2.1. <i>Geobacter sulfurreducens</i>	2
2.1.1 Modelo de la TEE	2
2.1.2. Biopelícula electroconductiva	5
2.1.3. Estudios “ómicos” de la biopelícula de <i>G. sulfurreducens</i>	6
3. Antecedentes	8
4. Justificación.....	12
5. Hipótesis.....	13
6. Objetivos	13
6.1. Objetivo general	13
6.2. Objetivos particulares.....	13
7. Materiales y métodos	14
7.1. Cepas y condiciones de cultivo	14
7.2. Manipulación de los ácidos nucleicos y las proteínas	15
7.3. Determinación del transcriptoma de la cepa mutante Δ <i>gsu1771</i> de <i>G. sulfurreducens</i>	15
7.3.1. Extracción de ARN de las biopelículas de <i>G. sulfurreducens</i>	15
7.3.2. Tratamiento con DNasa I	16
7.3.3. RNA-seq.	17
7.3.4. Análisis Bioinformático del RNAseq.....	18
7.4. Validación del RNA-seq	18
7.4.1. Transcripción reversa y PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	18
7.4. Validación del RNA-seq	19
7.4.1. Transcripción reversa y PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	19
7.4.2. Western Blot y tinción hemo	21
7.5. Determinación de la interacción de GSU1771 con genes específicos. ...	22
7.5.1. Purificación de la proteína GSU1771	22
7.5.2. Diálisis y concentración de la proteína GSU1771	23
7.5.3. Amplificación y purificación de regiones reguladoras	23
7.5.4. Ensayos de interacción ADN-proteína tipo EMSA	25

7.6. Predicción <i>in silico</i> de los posibles sitios de unión de la proteína GSU1771 sobre sus genes blanco.....	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
8.1. Perfil transcriptómico de la cepa $\Delta gsu1771$ en condiciones de formación de biopelícula.....	27
8.1.1 Condiciones de formación de la biopelícula en la cepa $\Delta gsu1771$ vs DL1	27
8.2. Validación del RNA-seq por RT-qPCR.....	31
8.3. Genes DE, relacionados con la formación de biopelícula y la TEE.....	31
8.3.1. Genes involucrados en la producción de exopolisacáridos	34
8.3.2. Genes involucrados en el transporte	36
8.3.3. Genes que codifican citocromos tipo-c y el geopili	38
8.3.4. Genes que codifican hidrogenasas.....	42
8.4. Genes con función regulatoria DE en el transcriptoma	43
8.4.1 Genes que participan en la regulación por di-GMPc y sistemas de Dos Componentes	43
8.4.2. Otros genes con función regulatoria	45
8.5. Unión de la proteína GSU1771 a las regiones de regulación de sus genes blanco.....	46
8.6. Análisis <i>in silico</i> de los posibles sitios de unión de GSU1771	47
8.7. Modelo de regulación global de la cepa $\Delta gsu1771$	49
9. Conclusiones.....	52
10. Perspectivas.....	53
11. Bibliografía	54
12. Material suplementario	61

Lista de figuras

Figura 1. Modelo de la TEE de <i>G. sulfurreducens</i>	2
Figura 2. Modelo de la estructura de la geopilina y de su polimerización en el nanocable.....	4
Figura 3. Dominios presentes en la proteína GSU1771.....	9
Figura 4. Modelo de regulación por GSU1771 y la cepa mutante $\Delta gsu1771$	11
Figura 5. Generación de condiciones anaerobias en el medio NBAF.....	14
Figura 6. Proceso del cultivo de <i>G. sulfurreducens</i>	14
Figura 7. Control de calidad de las muestras de ARN que se utilizaron en el RNA-seq.....	18
Figura 8. Purificación de la proteína GSU1771 y amplificación de regiones reguladoras para EMSAs.....	25
Figura 9. Curvas de crecimiento de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 y $\Delta gsu1771$ en medio NBAF a 25°C y 30°C.....	27
Figura 10. Imágenes de la biopelícula formada por las cepas DL1 y $\Delta gsu1771$	28
Figura 11. Integración del análisis del transcriptoma en IDEAMEX.....	29
Figura 12. Clasificación del total de genes de acuerdo a su anotación funcional y tipo de regulación.....	30
Figura 13. Contenido de citocromos tipo-c de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i> DL1 y $\Delta gsu1771$	41
Figura 14. Análisis de la expresión de PilA por Western blot.....	42
Figura 15. Ensayos EMSA entre las regiones reguladoras de los genes seleccionados y la proteína GSU1771.....	48
Figura 16. Predicción de secuencia consenso de reconocimiento de GSU1771.....	49
Figura 17. Modelo de los principales procesos celulares regulados en la cepa $\Delta gsu1771$	51
Figura S1. SDS-PAGE de control de carga de: A) tinción hemo y western Blot de B) OmcS y C) OmcZ.....	61
Figura S2. Control de carga del western blot de PilA.....	61
Figura S3. Resultados del análisis global de datos del RNA-seq.....	62

Figura S4. Integración de resultados del transcriptoma WT vs Δ gsu1771 en IDEAMEX.....	64
---	----

Lista de tablas

Tabla 1 Principales citocromos tipo- <i>c</i> de <i>G. sulfurreducens</i>	3
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para qPCR	19
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para amplificar regiones reguladoras.....	24
Tabla 4. Genes DE en el transcriptoma validados por RT-qPCR.....	32
Tabla 5. Genes con función putativa en la producción de exopolisacáridos, sobreexpresados en la cepa Δ gsu1771.....	33
Tabla 6. Genes que codifican posibles transportadores y que están sobreexpresados en la cepa Δ gsu1771.....	37
Tabla 7. Genes que codifican citocromos tipo- <i>c</i> regulados por GSU1771.....	40

Resumen

La producción de biopelícula electroactiva y la transferencia extracelular de electrones (TEE) a sustratos sólidos son funciones esenciales para las aplicaciones biotecnológicas de *Geobacter sulfurreducens* en la generación de bioelectricidad y la biorremediación de agua o de suelo contaminados con metales pesados. La delección del gen *gsu1771*, que codifica un regulador transcripcional de la familia SARP, produce una biopelícula electroactiva más gruesa en comparación con la cepa silvestre por lo que en este trabajo se determinó la respuesta transcriptómica global de la cepa mutante Δ *gsu1771* en condiciones de formación de biopelícula, mediante RNA-seq. El análisis del transcriptoma mostró que 467 genes están diferencialmente expresados (DE): 167 genes están sobreexpresados y 300 subexpresados. Entre los genes DE se identificaron varios que codifican para la producción de exopolisacáridos, transporte, metabolismo energético, transducción de señales y regulación. También se cuantificó la expresión de algunos genes seleccionados mediante RT-qPCR (*epsH*, *gsu0972*, *hybA*, *pgcA*, *omcM*, *aroG*, *panC*, *gnfK*, *gsu2507*, *acnA*, *ato-I*, *gsu0810*, *dcuB*, *pilA*, *ppcD*, *csrA* y *gsu3356*) confirmando lo obtenido por RNA-seq. Mediante ensayos de interacción DNA-proteína “EMSA” entre la proteína GSU1771 y las regiones reguladoras de *pgcA*, *omcM*, *hybE*, *pulF*, *gsu3356*, *relA*, *acnA* y *gsu1771*, se demostró que este regulador interactúa con todos los blancos probados. Por último, se identificó a través de MEME, los motivos de DNA comunes o más frecuentes entre las secuencias que demostraron mayor unión con la proteína GSU1771. Con base en este análisis se pueden proponer tres posibles secuencias consenso de unión a GSU1771. Con estos resultados pudimos observar que en la biopelícula sobre vidrio de la mutante Δ *gsu1771* hay un aumento de la expresión de genes relacionados a la producción de exopolisacáridos, el transporte, el metabolismo energético entre otros, así como un mayor contenido de citocromos tipo-c. Lo cual nos ayuda a entender el papel de GSU1771 en la regulación de la formación de biopelícula y la TEE.

1. Introducción

Las bacterias del género *Geobacter* (clase δ -proteobacteria, orden Desulfuromonadales, familia Geobacteraceae), son bacilos Gram negativos no móviles, no formadores de esporas y anaerobios (Coates, 2015). Los miembros de este género se encuentran ampliamente distribuidos en suelos y sedimentos acuáticos donde participan en la reducción desasimilatoria de metales, principalmente Fe(III) y Mn(IV), formando parte de los ciclos biogeoquímicos de estos elementos (Lloyd, 2003; Reguera y Kashefi, 2019; Weber et al., 2006).

Geobacter tiene la capacidad de acoplar la oxidación completa de compuestos orgánicos a un proceso de transferencia extracelular de electrones (TEE). Entre los compuestos que *Geobacter* puede emplear como donadores de electrones están entre otros muchos: el acetato, el formato, el etanol, el lactato, el propionato y algunos compuestos aromáticos, los cuales se oxidan hasta CO₂ y, los electrones generados se usan para crear un gradiente de protones en el periplasma que se usa para sintetizar ATP vía fosforilación oxidativa. Por último, al final de la cadena respiratoria, una gran cantidad de sustancias se pueden usar como aceptores de electrones. La mayor parte de ellos son óxidos metálicos insolubles de Fe(III), Mn(IV), U(VI), Co(III), Pd(II), Au(III), sin embargo, también se pueden usar el malato, el nitrato, el fumarato, sustancias húmicas, entre otros (Lovley et al., 2011; Coates, 2015; Reguera y Kashefi, 2019).

Debido al su capacidad de usar un amplio repertorio de donadores y aceptores de electrones, las especies de *Geobacter* han sido foco de investigación durante los últimos 30 años ya que tienen un enorme potencial biotecnológico como la generación de bioelectricidad en celdas microbianas de combustible y la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados e hidrocarburos (Lovley et al., 2011; Reguera y Kashefi, 2019).

2. Marco Teórico

2.1. *Geobacter sulfurreducens*

La mayoría del conocimiento que tenemos de *Geobacter* se ha generado en el estudio de la cepa modelo *G. sulfurreducens* DL1 (También llamada PCA) (Lovley et al., 2011; Reguera y Kashefi, 2019), dicha cepa se aisló a partir de sedimentos en una zanja contaminada con hidrocarburos cerca de Norman Oklahoma (Caccavo et al., 1994). Esta especie es capaz de usar azufre molecular como aceptor de electrones (de ahí su nombre) e H_2 como único donador de electrones y además de ser aerotolerante (Caccavo et al., 1994; Lin et al., 2004). Su genoma fue el primero de este género en ser secuenciado (3.8 Mpb) y también fue la primera especie de *Geobacter* en la que se pudo desarrollar un sistema para su manipulación genética (Methe et al., 2003; Coppi et al., 2001). Esto ha permitido que sea el principal modelo para el estudio de la TEE, y sus aplicaciones.

2.1.1 Modelo de la TEE

El mecanismo de TEE involucra una gran cantidad de citocromos tipo-c y un *pili* tipo IV (PTIV) (Figura 1) (Ueki, 2021). Respecto a los citocromos, son muy abundantes en las especies de *Geobacter* ya que hay genomas de cepas de este género que codifican más de 100 de estas proteínas; sin embargo, la presencia y conservación de estos citocromos varía entre las especies del género (Estevez-Canales et al., 2015; Butler et al., 2010).

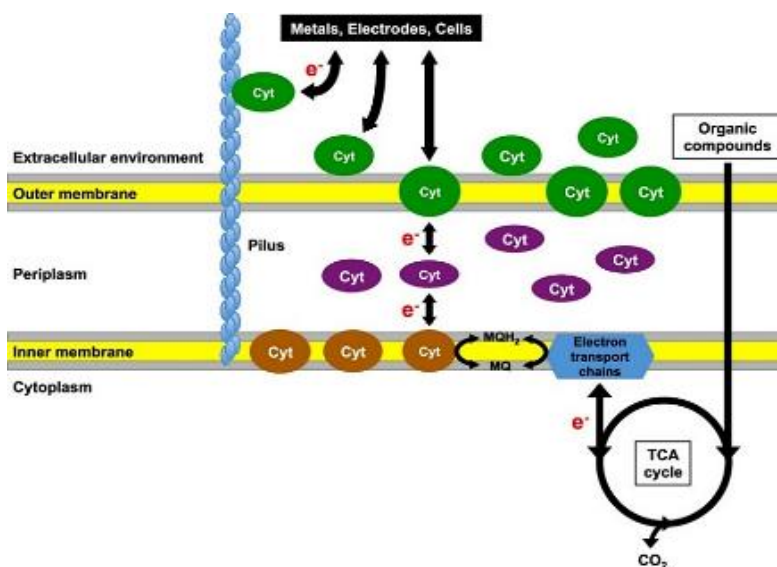


Figura 1. Modelo de la TEE de *G. sulfurreducens* que involucra un gran número de citocromos tipo-c y al pili tipo IV (Ueki, 2021).

Tabla 1 Principales citocromos tipo-c de *G. sulfurreducens*

Nombre	Descripción	Bibliografía
PpcA-E	Esta familia de citocromos tri-hemo están conservados en varias especies de <i>Geobacter</i> . La producción de PpcA es constitutiva mientras que la de PpcD se induce durante la reducción de Fe(III), además de que ambos contribuyen a generar el gradiente de protones en el periplasma para la síntesis de ATP. La ausencia de PpcB, PpcC y PpcE favorecen la reducción de Fe(III).	(Pokkuluri et al., 2004; Butler et al., 2010; Lovley et al., 2011; Morgado et al., 2010)
OmcB/C	Estos citocromos están codificados en una región duplicada del cromosoma de 10 Kpb y comparten un 79% de identidad. Una delección de ambos citocromos reduce considerablemente la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV); sin embargo, no afecta la TEE a un electrodo. Al ser redundantes, evidencia experimental sugiere que hay cooperación entre ambos citocromos.	(Leang et al., 2003; Nevin et al., 2009; Liu et al., 2015; Jimenez Otero et al., 2018)
OmcE	Participa en la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV). En una mutante en este citocromo se ve afectada la reducción, pero después de 30 días, se recupera este proceso hasta llegar a niveles comparables con la cepa silvestre. Su delección no afecta la transferencia de electrones al electrodo.	(Mehta et al., 2005; Nevin et al., 2009)
OmcS	Está adherido a lo largo del Pili tipo IV, participa en la reducción de óxidos de Fe(III) y Mn(IV). Sin embargo, no hay evidencia de que contribuya a la TEE a un electrodo.	(Nevin et al., 2009; Aklujkar et al., 2013; Leang et al., 2010)
OmcZ	Su producción se induce durante el crecimiento en óxido de Mn(IV), pero no en presencia de óxido de Fe(III). La delección de este citocromo afecta la transferencia de carga a electrodos. Este citocromo tiene dos isoformas: OmcZL de 50 kDa y OmcZs 30 kDa siendo la forma activa OmcZs.	(Aklujkar et al., 2013; Nevin et al., 2009; Ki et al., 2021)
PgcA	Aunque originalmente PgcA se describió como un citocromo periplásmico, actualmente se describe como un citocromo extracelular donde participa en la transferencia de electrones a óxidos de Fe(III) y Mn(IV) pero no a citrato de Fe(III) o a un electrodo. Este citocromo actúa como lanzadera de electrones en la TEE, incluso compensando una cepa deficiente de <i>pilA</i> en en donde donde la célula aumenta la secreción de este citocromo al medio extracelular.	(Aklujkar et al., 2013; Smith et al., 2014; Zacharoff et al., 2017)

G. sulfurreducens es la especie más estudiada de su género en donde más se ha investigado el papel de los citocromos y donde se han caracterizado algunos de estos. Ejemplos importantes son la familia de citocromos periplásmicos tri-hemo PpcA (PpcA-E), los citocromos de membrana externa con múltiples grupos hemo: OmcB, OmcC, OmcE, OmcS, OmcZ y el citocromo extracelular tri-hemo PgcA cuyas funciones se resumen en la Tabla 1.

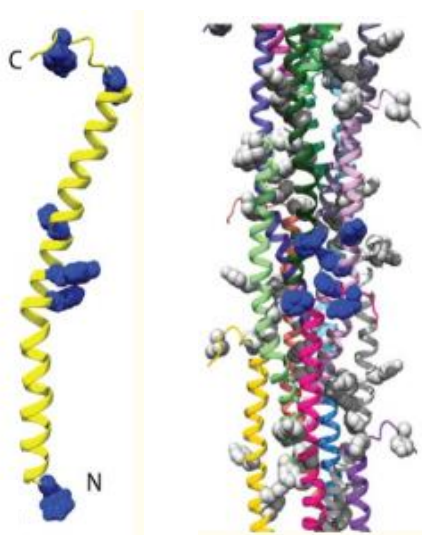


Figura 2. Modelo de la estructura de la geopilina y de su polimerización en el nanocable. En los modelos resaltan en azul los aminoácidos aromáticos importantes para la conducción eléctrica (Reardon y Mueller, 2013)

Los citocromos actúan en conjunto con el pili tipo IV (PTIV) el cual es único ya que tiene la capacidad de aceptar los electrones de la cadena respiratoria y conducirlos hasta su aceptor final, funcionando como un nanocable (Reguera et al., 2005; Reguera, 2018a). El PTIV es un apéndice que muchas bacterias proyectan hacia el espacio extracelular con un diámetro de 6-9 nm y varias micras de largo al cual se le han asociado diversas funciones como: la adherencia, la formación de biopelículas, el movimiento tipo “*twitching*” y “*gliding*”, recepción de ADN, entre otras (Hospenthal et al., 2017). El PTIV se forma por la polimerización de una

proteína llamada pilina o PilA que es la subunidad principal del *pili* (Hospenthal et al., 2017).

El *pili* de *Geobacter* acepta los electrones de los componentes periplásmicos y de la membrana externa y los conduce hasta su aceptor final, a manera de un nanocable. Al PTIV de las especies de *Geobacter* se le suele denominar geopili y geopilina a la proteína estructural PilA (Reguera et al., 2005). Se propone que las propiedades electroconductoras del *pili* de *Geobacter* se deben a la estructura de PilA que durante la polimerización del nanocable se produce un sobre posicionamiento de los enlaces π (π) entre los aminoácidos aromáticos (Figura 2), lo cual le brinda una conductividad tipo metálica (Reardon y Mueller, 2013;

Malvankar et al., 2015; Holmes et al., 2016). El geopili se ha estudiado ampliamente en *G. sulfurreducens*, así como en *G. metallireducens* (Reguera et al., 2005; Reguera et al., 2006; Reguera et al., 2007; Reardon y Mueller, 2013; Malvankar et al., 2015; Holmes et al., 2016; Speers et al., 2016; Steidl et al., 2016; Reguera, 2018b; Liu et al., 2020).

Los nanocables son esenciales para la reducción de los aceptores de electrones insolubles como los óxidos de Fe(III) y Mn(IV) pero no para la reducción de aceptores solubles como el citrato Fe(III) y el fumarato. Por lo que se propone que podrían ser la conexión entre la célula y los aceptores de electrones insolubles y que es lo que permite la TEE a larga distancia (Reguera et al., 2005). Durante este proceso participan las ATPasas PilB y PilT que tienen un rol importante al polimerizar y despolimerizar el nanocable respectivamente, manteniendo la cantidad de *pili* adecuada para una correcta respiración (Speers et al., 2016; Steidl et al., 2016). Los nanocables también pueden ser usados como componente de dispositivos electrónicos (Reguera, 2018b). Una de sus aplicaciones más recientes es la generación de electricidad a partir de la humedad del ambiente (Liu et al., 2020).

2.1.2. Biopelícula electroconductiva

G. sulfurreducens, tiene la capacidad de formar biopelículas en electrodos de celdas microbianas de combustible y producir bioelectricidad usando compuestos orgánicos (preferentemente acetato) o H₂ como donadores de electrones (Bond y Lovley, 2003).

La biopelícula está formada por un agregado celular o una comunidad microbiana que crece adherida en una superficie, embebidas en una compleja matriz extracelular secretada por las células y formada principalmente por exopolisacáridos, proteínas, lípidos y otras biomoléculas (Flemming et al., 2016). En este estado fisiológico se encuentran la mayor parte de las bacterias en sus nichos ecológicos ya que es una estructura que les brinda protección, favorece la cooperación entre las bacterias, permite la circulación de nutrientes y de los desechos, entre otras (Flemming et al., 2016). Durante el proceso de formación de biopelícula primero se adhieren las bacterias a una superficie por medio de estructuras como fimbrias, flagelo y adhesinas. Posteriormente, comienzan a producir la matriz extracelular a medida que aumenta la población; este proceso

está altamente regulado principalmente por los sistemas de transducción de señales como la precepción del *quorum* y la señalización por di-GMPc (Flemming et al., 2016). Las biopelículas bacterianas tienen aplicaciones biotecnológicas en la biorremediación de aguas residuales, la degradación de residuos sólidos, y la biocatálisis, por mencionar algunos ejemplos (Flemming et al., 2016).

La matriz extracelular es el principal componente de la biopelícula (Flemming et al., 2016), por lo tanto, su estudio en la biopelícula electroconductiva es de suma importancia. Estudios recientes han revelado que la matriz extracelular de la biopelícula de *G. sulfurreducens* adherida al electrodo de una celda microbiana de combustible se forma principalmente de proteínas y carbohidratos, seguidos de ácidos urónicos, lípidos y cantidades mínimas de ADN extracelular (Stöckl et al., 2019). El alto contenido proteico corresponde principalmente a los nanocables y los citocromos requeridos para la TEE (Nevin et al., 2009; Reguera et al., 2006; Reguera et al., 2007). Por su parte, los exopolisacáridos se han estudiado ampliamente como uno de los principales componentes de la matriz extracelular en las biopelículas bacterianas ya que forman parte de la estructura, le dan estabilidad, así como la capacidad de adherirse entre células y a las superficies abióticas (Limoli et al., 2015). En *G. sulfurreducens* los exopolisacáridos permiten la aglutinación entre células, favorecen la adherencia a superficies y permiten el anclaje de algunos citocromos en la matriz extracelular (Rollefson et al., 2011; Zhuang et al., 2020). Una cepa de *G. sulfurreducens* modificada para sobreproducir exopolisacáridos, aumenta su capacidad de reducir Fe(III) y forma una biopelícula más gruesa y electroconductiva (Zhuang et al., 2020).

2.1.3. Estudios “ómicos” de la biopelícula de *G. sulfurreducens*

Las bacterias detectan las diferentes condiciones ambientales y responden con cambios fenotípicos que son el resultado de complejas redes de regulación a distintos niveles. Debido a ello, el simple estudio del genoma o de genes individualmente no es suficiente para entender esos cambios por lo que en las últimas décadas se han desarrollado y mejorado las plataformas “ómicas” que nos permiten estudiar el total de genes de un organismo (genómica), la transcripción de genes en determinadas condiciones (transcriptómica), la

traducción y modificaciones postraduccionales (proteómica) y los procesos bioquímicos (metabolómica) (Zhang et al., 2010).

En *G. sulfurreducens* se han hecho algunos estudios para evaluar de manera global los cambios fisiológicos que presenta al momento de pasar del estado planctónico a biopelícula. El primer trabajo reportado que describe este proceso fue el realizado por Nevin y colaboradores, en el que empleando microarreglos, obtuvieron el perfil transcriptómico de biopelículas de *G. sulfurreducens* crecidas en celdas microbianas de combustible usando electrodos de grafito como aceptor de electrones. En dichos estudios se observó que en condiciones de formación de biopelícula, se favorecía la transcripción de diversos genes entre los que están: *pilA*, *omcB*, *omcZ* y genes que codifican transportadores tipo ABC (ATP-Binding Casette) durante la respiración de electrodo. Por otro lado, los genes de los citocromos OmcS y OmcT, así como de proteínas involucradas en el transporte transmembranal, disminuyeron su expresión en esas condiciones (Nevin et al., 2009). En otro estudio más reciente, mediante proteómica comparativa de biopelículas de *G. sulfurreducens* usando un electrodo como aceptor de electrones y células planctónicas durante la reducción de fumarato como control; encontraron que en la biopelícula disminuye la expresión de proteínas involucradas en la producción de energía, mantenimiento, metabolismo de aminoácidos y metabolismo central, así como la replicación de ADN (Kavanagh et al., 2016). Esto refleja cómo las células se adaptan disminuyendo diferentes procesos metabólicos y de esa manera favorecer la producción de proteínas de la membrana externa, los lipopolisacáridos, el peptidoglicano y el *pili*, necesarios para la formación de la biopelícula (Kavanagh et al., 2016). También se encontró la presencia de múltiples sistemas de secreción (tipo I, II, V y VI), transportadores tipo ABC y de la vía de SEC-YEG, lo cual sugiere que son importantes para exportar los componentes de membrana externa y extracelulares que componen la matriz extracelular (Kavanagh et al., 2016).

2.1.4. Estudios de regulación genética en *G. sulfurreducens*

Los estudios de regulación genética en *G. sulfurreducens*, se han enfocado en parte en estudiar el cómo se regula la expresión de los citocromos y el PTIV, debido a sus aplicaciones biotecnológicas. Un dato interesante de *G.*

sulfurreducens es que tiene el número más alto de sistemas de Dos Componentes, respecto al tamaño de su genoma (Methe et al., 2003). Estos sistemas participan en la transducción de señales en bacterias y constan de una Histidina Quinasa (HK), la cual es una proteína de membrana que mediante un dominio sensor detecta señales ambientales que provocan un cambio conformacional, autofosforilándose en un residuo de histidina; el grupo fosforil es a su vez transferido al segundo componente de este sistema, una proteína Reguladora de Respuesta (RR), la cual generalmente es un regulador transcripcional (Wang., 2012). Mediante estos sistemas la célula modula una amplia gama de funciones, entre ellas la formación de biopelícula (Wang., 2012). *G. sulfurreducens* cuenta con 90 HK y 93 RR, algunos de los cuales son reguladores transcripcionales de la familia EBP (Enhancer Binding Protein) (Methe et al., 2003). En *G. sulfurreducens*, el sistema de Dos Componentes mejor estudiado es PilS/PilR donde PilS es la HK y PilR el RR el cual es una EBP dependiente del factor sigma 54, que modula la expresión de una gran cantidad de genes, entre ellos: *pilA*, genes involucrados en la producción de los exopolisacáridos y de algunos citocromos tipo-c (Juarez et al., 2009; Krushkal et al., 2010; Hernández-Eligio et al., 2017; Huerta-Miranda et al., 2019;). Una característica relevante de este regulador es que datos experimentales en un sistema de expresión heterólogo, indican que es la forma no fosforilada de PilR la que activa la expresión de *pilA*, más que la fosforilada (Hernandez-Eligio et al., 2017).

3. Antecedentes

En un trabajo previo, mediante ensayos de evolución adaptativa donde se creció a *G. sulfurreducens* durante dos años en óxidos de Fe(III) insolubles, se logró aislar dos cepas denominadas V1 y V2 las cuales presentaron un aumento considerable en la reducción de óxidos de Fe(III) con respecto a la cepa silvestre; este incremento se relacionó a que en estas cepas se incrementa la transcripción de los genes *pilA* y *pgcA* (Tremblay et al., 2011). Al secuenciar sus genomas, se encontró que ambas cepas presentaban mutaciones en el gen *gsu1771*, que codifica una proteína perteneciente a la familia SARP (Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins) (Tremblay et al., 2011). Esta familia de reguladores transcripcionales se describió por primera vez en *Streptomyces* como

activadores de la síntesis de antibióticos que, mediante un motivo de unión a ADN tipo hélice alada localizado en el C-terminal, reconocen repetidos en tándem de ~7 pb entre las secuencias -10 y -30 en promotores de los genes que regula y así favorecen su interacción con la ARN polimerasa (Wietzorrek y Bibb, 1997). A pesar de que estos reguladores generalmente se describen como activadores transcripcionales, de acuerdo con los trabajos hasta ahora en *G. sulfurreducens*, se sugiere que GSU1771 actúa principalmente como un represor transcripcional (Tremblay et al., 2011; Hernández-Eligio et al., 2022).

El análisis *in silico* de la secuencia de *gsu1771* mostró que su contenido de GC es de 48% a diferencia del 60.94% que tiene el genoma de *G. sulfurreducens*, lo que sugiere que este gen se adquirió por transferencia horizontal (Hernández-Eligio et al., 2022). Por otro lado, mediante análisis de la secuencia de aminoácidos se identificaron tres dominios: un regulador de respuesta hacia el N-terminal (similar al presente en sistemas de Dos Componentes), un dominio activador central (similar a los presentes en la familia SARP) y un dominio de unión a ADN tipo hélice alada hacia el C-terminal (Figura 3) (Hernández-Eligio et al., 2022).

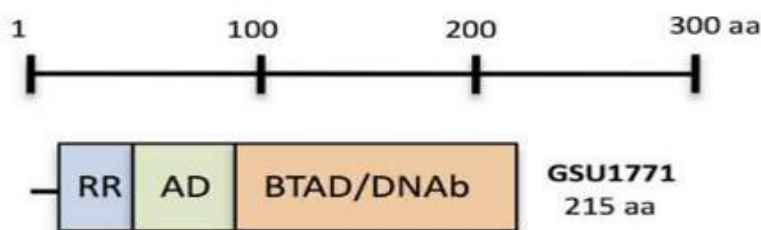


Figura 3. Dominios presentes en la proteína GSU1771. RR, regulador de respuesta; AD, dominio activador; BTAD, dominio activador transcripcional bacteriano; DNAb, dominio de unión a ADN (Hernández-Eligio et al., 2022).

En nuestro grupo de trabajo, se encontró que la delección del gen *gsu1771* (cepa Δ *gsu1771*) presenta un fenotipo de crecimiento más lento que la cepa silvestre al emplear fumarato como aceptor de electrones. Sin embargo, esta cepa mutante reduce óxidos de Fe(III) insoluble a Fe(II) dos veces más rápido que la cepa silvestre. Estudios recientes demuestran que la cepa Δ *gsu1771* aumenta la expresión citocromos tipo-c y por otro lado, disminuye la expresión de genes relacionados con el metabolismo del fumarato (Hernández-Eligio et al., 2022).

Esta hipótesis se comprobó mediante RT-qPCR en donde se observó que en la cepa $\Delta gsu1771$ además de *pilA*, también los genes que codifican los citocromos tipo-c: *omcB*, *omcC*, *omcE*, *omcS* y *omcZ* se sobreexpresan, lo que sugiere que GSU1771 actúa como represor transcripcional de estos genes; sin embargo, la transcripción de los genes *dcuB* y *frdC* que están involucrados en el metabolismo del fumarato, también se incrementa. Por lo tanto, el crecimiento más lento de la cepa $\Delta gsu1771$ se debe a la alteración de otra vía metabólica (Hernández-Eligio et al., 2022).

Con la finalidad de caracterizar el mecanismo de regulación que ejerce GSU1771 sobre sus genes blanco, se realizaron ensayos EMSA donde se encontró que esta proteína se une a las regiones promotoras de *pilA*, *omcS*, *omcE*, *omcZ*, *dcuB*, y *frdC*; dicho resultado aunado al obtenido por la RT-qPCR, sugieren que este regulador reprime estos genes. En contraste, GSU1771 no se une a las regiones promotoras de *omcB/C*, lo que pudiera indicar que estos genes se regulan de manera indirecta (Hernández-Eligio et al., 2022).

En la cepa $\Delta gsu1771$ también se favorece la aglutinación y la producción de exopolisacáridos, formando una biopelícula tres veces más gruesa que la cepa silvestre. Mediante estudios electroquímicos por voltamperometría cíclica, se encontró que la biopelícula de la cepa mutante llega a ser hasta 100 veces más conductiva que la que forma la cepa silvestre (Hernández-Eligio et al., 2022). Por otro lado, otro trabajo reciente de nuestro grupo, ha revelado que IHF (Integration Host Factor) regula la expresión de *gsu1771*. El heterodimero formado por IHFA-1 e IHFB-2 se une a la región promotora de *gsu1771* reprimiendo de esta forma, su expresión (Andrade et al., 2021). El modelo de regulación de GSU1771 y los fenotipos de la cepa mutante $\Delta gsu1771$ se resumen en la Figura 4.

En *G. sulfurreducens* se conoce que los citocromos tipo-c, el pili, y la producción de exopolisacáridos son elementos necesarios en la formación de biopelícula y la TEE (Reguera et al., 2005; Reguera et al., 2006; Reguera et al., 2007; Juárez et al. 2009; Butler et al., 2010; Morgado et al., 2010; Estevez-Canales et al., 2015;). Sin embargo, se desconoce cuántos y cuáles de los más de 100 citocromos tipo-c que presenta *G. sulfurreducens* están regulados por GSU1771

y mediante qué vías se controla la producción de exopolisacáridos y demás componentes esenciales para la formación de biopelícula.

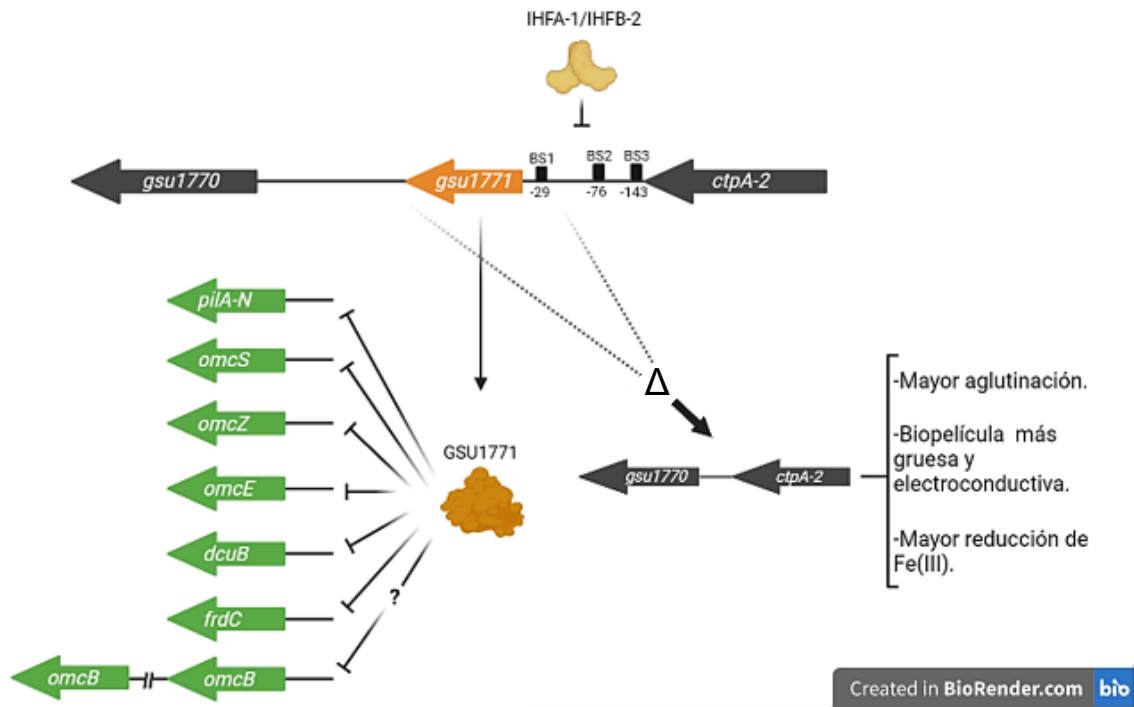


Figura 4. Modelo de regulación por GSU1771 y la cepa mutante Δ *gsu1771*.

4. Justificación

G. sulfurreducens es un microorganismo que tiene aplicaciones biotecnológicas como son la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, además de la producción de bioelectricidad en celdas microbianas de combustible. Por estas razones se han realizado esfuerzos para entender el mecanismo de formación de biopelícula y TEE, así como los elementos regulatorios que controlan esos procesos. Se ha observado que la mutante *Δgsu1771* de *G. sulfurreducens* produce una biopelícula más gruesa y electroconductiva que la cepa silvestre. Esto se relaciona con la sobreexpresión de *pilA* y diversos citocromos tipo-c. En este sentido, el conocer de manera global los genes modulados por GSU1771, así como su mecanismo de acción, permitirá tener una mejor comprensión de los procesos que *G. sulfurreducens* utiliza para regular la producción de biopelícula y la TEE.

5. Hipótesis

Si la cepa mutante $\Delta gsu1771$ produce una biopelícula más gruesa y aumenta la reducción de Fe(III) así como la producción de bioelectricidad, entonces es GSU1771 es un regulador transcripcional global, que modula genes involucrados en la formación de biopelícula y la TEE.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Caracterizar el regulón de GSU1771 en *G. sulfurreducens* en condiciones de formación de biopelícula.

6.2. Objetivos particulares

- Definir el perfil transcriptómico de la mutante $\Delta gsu1771$ de *G. sulfurreducens* en condiciones de formación de biopelícula.
- Identificar genes relacionados con la TEE y formación de biopelícula que se encuentren bajo el control de GSU1771 y validar su expresión.
- Determinar si existe unión entre GSU1771 y genes específicos de su regulón.
- Predecir posibles motivos de unión de GSU1771 en sus genes blanco.
- Proponer un mecanismo de regulación global identificando el papel de GSU1771 en la transferencia extracelular de electrones y la formación de biopelícula en *G. sulfurreducens*.

7. Materiales y métodos

7.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se usaron las cepas *G. sulfurreducens* DL1 (Caccavo et al., 1994) y *G. sulfurreducens* Δ *gsu1771* (Hernández-Eligio et al., 2022) las cuales se crecieron en medio NBAF suplementado con 100 mM de cisteína y 0.05% de extracto de levadura, en condiciones anaerobias (Coppi et al., 2001). El proceso para realizar los cultivos anaerobios se esquematiza en las Figuras 5 y 6.

La cepa de *E coli* MC1061 transformada con la construcción pBAD/His-GSU1771 (Hernández-Eligio et al., 2022) usada para purificar la proteína GSU1771, se cultivó en medio LB con 200 μ g/ml de ampicilina.

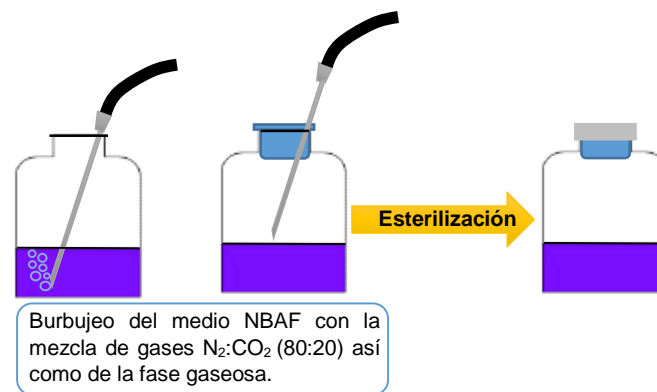


Figura 5. Generación de condiciones anaerobias en el medio NBAF.

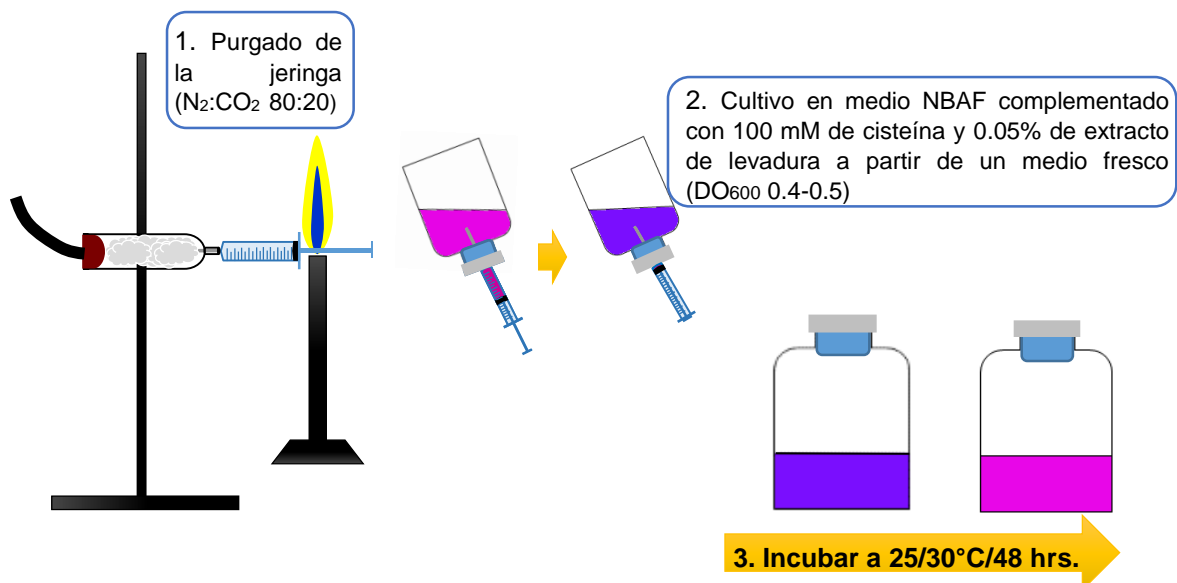


Figura 6. Proceso del cultivo de *G. sulfurreducens*.

7.2. Manipulación de los ácidos nucleicos y las proteínas

La manipulación del ADN, del ARN y de las proteínas se realizaron conforme a los protocolos de biología molecular estandares (Sambrook et al., 1989).

Las electroforesis de ADN y ARN se realizaron de la siguiente forma: las muestras se mezclaron con buffer de carga (30% de glicerol, 1% bromuro de etidio y ~0.001% azul de bromofenol), se cargaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X y se sometieron a electroforesis a 120 V. Posteriormente se visualizaron en un fotodocumetador "Gel Doc EZ Imager" de Bio-Rad.

Las electroforesis de proteínas se realizaron como se describe a continuación: los extractos proteicos se mezclaron con buffer Laemmli (50% glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 0.125M Tris-HCl ph 6.8, 0.004% azul de bromofenol), se calentaron a 95°C por 5 minutos y se separaron con un SDS-PAGE al 12% en buffer Tris-glicina SDS a 120 V por 1-2 horas y finalmente las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. La electroforésis de interacciones ADN-proteína se realizaron en condiciones nativas en geles de poliacrilamida al 6% en TBE al 0.5X. Para teñir los geles se sumergieron en una solución de bromuro de etidio al 0.1% por 10 segundos y se visualizaron en el fotodocumentador.

7.3. Determinación del transcriptoma de la cepa mutante *Δgsu1771* de *G. sulfurreducens*

7.3.1. Extracción de ARN de las biopelículas de *G. sulfurreducens*

Se crecieron cultivos por duplicado de las cepas de *G. sulfurreducens* DL1 y *Δgsu1771* en frascos con 100 ml de medio NBAF y se incubaron a 25°C por 48 horas (Figura 6). A las 48 horas, se extrajo todo el medio de cultivo con las células planctónicas, cuidando la integridad de la biopelícula formada en el fondo de los frascos del cultivo (Figura 10). Después, las biopelículas se resuspendieron mecánicamente con 1 ml de medio NBAF y se transfirieron a tubos estériles de 1.5 ml. A cada tubo se le agregó 100 µl de RNAlater (Quiagen) y se incubaron en hielo por 30 minutos. Al final, las células se concentraron por centrifugación a 14,000 rpm por 2 minutos. La extracción de ARN se realizó con el kit RNeasy mini kit (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se eluyó con 70 µl de agua libre de RNAsas. La concentración de ARN se

determinó espectrofotométricamente con un NanoDrop 200c (Thermo Scientific) y la integridad se verificó mediante electroforesis. Finalmente, el ARN se almacenó a -70°C.

7.3.2. Tratamiento con DNasa I

Debido a que las muestras de ARN contenían ADN contaminante, se trataron con DNasaI (Thermo Fisher Scientific) de la siguiente forma:

Reactivo	Cantidad
DNaseI (1U/ µl)	3.6 µl
Buffer 10X	2.5 µl
ARN	10 µg
H ₂ O libre de RNasas	Para ajustar a un volumen de 25 µl
Condiciones de reacción	
37°C	70 min

Posteriormente se realizó una PCR punto final para verificar la eliminación del ADN contaminante y una electroforesis para confirmar la integridad del ARN. Las condiciones de PCR se muestran abajo.

Reactivo	Cantidad (µl)
Oligo fw (10 pmol/ul)	1
Oligo rv (10 pmol/ul)	1
Buffer 10X	1
MgCl ₂	0.5
dNTP's (10 mM)	0.5
Taq polimerasa	0.1
ARN	0.5
H ₂ O	5.4

Condiciones de reacción

93°C	3 min	x1
93°C	40 seg	} x30
60°C	40 seg	
72°C	30 seg	
72°C	5 min	x1

Finalmente se realizó la remoción de la DNasa I y nucleótidos libres con el RNeasy mini Kit de Quiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron nuevamente y se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

7.3.3. RNA-seq.

El diagrama general de trabajo que se siguió fue el siguiente:



Las bibliotecas de ARN mensajero y su posterior secuenciación se realizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT-UNAM (www.uusmb.unam.mx) usando la tecnología "Illumina® Stranded mRNA Prep". Los requerimientos de las muestras fueron las siguientes:

Muestra	Cantidad	Volumen	A260/A280	A260/A230	RIN (RNA Integrity Number)
ARN total	5-10 µg	≤ 50µl	≥ 1.8	~1.8	≥ 7

Antes de generar las bibliotecas de ADNc, se verificó la integridad y concentración del ARN en un chip Nano 6000 en el Bioanalyzer. En la Figura 7 se muestra la electroforesis de ARN proveniente de las células de las biopelículas, analizadas

en Bioanalyzer y los datos de control de calidad de las muestras antes de ser procesadas para generar las bibliotecas y su posterior secuenciación.

Seguido, se realizó la remoción del ARN ribosomal usando el “Ribominus kit”. Las bibliotecas de ADNc se construyeron usando el kit “TruSeq Standard mRNA” y se purificaron con el “Zimoclean Gel DNA Recovery Kit”. Finalmente, las bibliotecas se secuenciaron usando la plataforma de “Illumina nextseq 500” (protocolo a detalle en: Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation Reference Guide (1000000124518) (unam.mx)

7.3.4. Análisis Bioinformático del RNAseq

El análisis de expresión diferencial de las bibliotecas secuenciadas, se realizó mediante el uso de la plataforma IDEAMEX (Integrative Differential Expression Analysis for Multiple Experiment) (<http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>). Se realizó el análisis en 3 pasos: **1.** Análisis de control de calidad de las muestras (Figura S3), **2.** Análisis de expresión diferencial usando los métodos “edgeR” (Robinson MD 2010), “DESeq2” (Love MI 2014), “limma–voom” (Ritchie ME 2015) y “NOISeq” (D. J. Tarazona S Garcia-Alcalde F 2011) y **3.** Integración de resultados de los 4 métodos (Figura S4). Se eligieron los genes diferencialmente expresados (DE) que en los 4 métodos tuvieran un “ p value” <0.05 y un “Log2 fold change” >1.5 . Los nombres de cada gen, así como su anotación y definición se obtuvieron de la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa y Goto 2000).

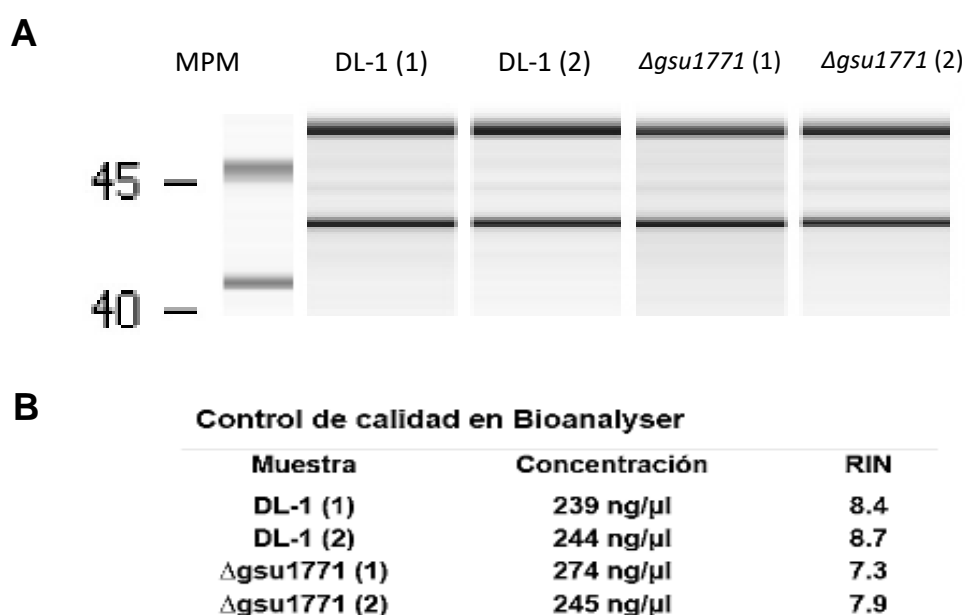


Figura 7. Control de calidad de las muestras de ARN que se utilizaron en el RNA-seq. A) Electroforesis en Bioanalyzer del ARN tratado con DNase I y repurificado por columna. **B)** concentración y número de RIN de las muestras de RNA.

7.4. Validación del RNA-seq

7.4.1. Transcripción reversa y PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Se purificó ARN de biopelículas de las cepas *G. sulfurreducens* DL1 y $\Delta gsu1771$ como se describió anteriormente y se realizó transcripción reversa (RT) usando el kit “Revert Aid First Strand DNA Synthesis” de Thermo Fisher Scientific usando los oligonucleótidos reversos que se listan en la Tabla 2. Las condiciones de reacción se muestran a continuación:

Reacción 2	
Reactivo	Cantidad (µl)
Reacción 1	12.0
dNTP's	2.0
Ribolock	1.0
Buffer 5x	4.0
RT	1.0
Total	20.0

Condiciones de reacción	
42°C	60 min
70°C	10 min

La qPCR se realizó usando la “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se realizaron por triplicado de la siguiente forma:

Reactivo	Cantidad (µl)
SYBR Green Master mix 2x	5.0
Oligos (5pmol/ µl)	1.0
ADNc 1:10	0.5
H2O	3.5
Total	10.0

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un “Rotor-Gene® Q MDx” (QUIAGEN) y las condiciones fueron las siguientes:

Condiciones de reacción		
95°C	10 min	x1
95°C	10 seg	} x40
60°C	60 seg	

El cálculo de la expresión relativa se realizó en el programa Rotor-Gene Q Series Software mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ tomando la expresión del gen *gsu2822* como normalizador.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para qPCR

Nombre	Secuencia 5' 3'	Referencia
qPCRRepsHfw	CTA TGC AGC CCT CAC CAT CC	Este trabajo
qPCRRepsHrv	GTG AAT GAC ATT GCC CTC GC	Este trabajo
qPCRomcMfw	TGGAGACTACCCATGCTGAA	Hernandez-Eligio et al., 2020
qPCRomcMrev	AGACGTCGAGGTGCTCGTAT	Hernandez-Eligio et al., 2020
qPCRaroG2fw	CAA TGC CCA GAA CTT TGC CC	Este trabajo
qPCRaroG2rv	TCA TGA CAT ACT CGG CGC TC	Este trabajo
qPCRhybAfw	GTG GCC TAC AAC AAG AAC GC	Este trabajo
qPCRhybArv	ATC GCA CTT GAC GAT CTG GG	Este trabajo
qPCRpgcAFw	GTCTCCAGAGTGCCGTAAGC	Hernandez-Eligio et al., 2022
qPCRpgcARev	AGTAGGAGCCACTGCCAAGA	Hernandez-Eligio et al., 2022
qPCR0941fw	GGTCCTTTCTTTACCCGCC	Hernandez-Eligio et al., <i>sometido_b</i>
qPCR0941rv	GAGCGTTTATGGGCCTCGTA	Hernandez-Eligio et al., <i>sometido_b</i>
qPCRpanCfw	CTA TCT CCA CGA CGG ACA CG	Este trabajo
qPCRpanCrv	TGG TGA AAT CCT CGT TGG GG	Este trabajo
qPCR0972fw	AAC TCA CGT CGC TCA TGG AC	Este trabajo
qPCR0972rv	ATG AAC ACG TCG GAG GGA TG	Este trabajo
qPCR2507fw	TCG GCC GTG ACT ATT CGT TC	Este trabajo
qPCR2507rv	GCG GTG AAC ATT ACA ACG GG	Este trabajo
qPCRpilAfw	TC GGT ATT CTC GCT GCA AT	Andrade et al., 2021
qPCRpilArev	AAT GCG GAC TCA AGA GCA GT	Andrade et al., 2021
qPCRdcuBFw	GCC ATC AAG ACC GGT ATC C	Andrade et al., 2021
qPCRdcuBrev	AGC CGA GGA AAA AGG TCA CT	Andrade et al., 2021
qPCRacnAFw	CCCGCTACAACCTACCACTCC	Andrade et al., 2021
qPCRacnARev	CGCAAAAGGTTTTCCAGAAG	Andrade et al., 2021
qPCR0810fw	TGA GGG ACA CAC CGA CAA TG	Este trabajo
qPCR0810rv	TCC CGA AAT TGT CCA CCA GG	Este trabajo
qPCRcsrAfw	CAT CGA GGC TCC CAA CGA C	Este trabajo
qPCRcsrArv	GTT ACC GCC TTC TCC AGG TC	Este trabajo
qPCRpurE2fw	GGC CCA TAA GGA AGG GGT G	Este trabajo

qPCRpurE2rv	AAC CGA TGA CCG GCA ATC TC	Este trabajo
qPCRato1fw	CAT CGC CAA CGC TGT AAT CG	Este trabajo
qPCRato1rv	ATC GAA CAG GTC GAG CAT GG	Este trabajo
qPCR3356fw	GCGCTTTCTTCATCGCTATC	Hernández-Eligio et al., 2020
qPCR3356rv	GCAACCCCTGATTAGTCTCG	Hernández-Eligio et al., 2020
qPCRppcDfw	CAGCACTCACCTGTTCTGT	Hernández-Eligio et al., 2020
qPCRppcDrev	TGCTTTTTGTGGTCGAAGGT	Hernández-Eligio et al., 2020

7.4.2. Western Blot y tinción hemo

Se crecieron cultivos de las cepas silvestre y $\Delta gsu1771$ en frascos con 20 ml de NBAF a 25 y 30°C. Para cosechar células planctónicas se agitaron algunos de los cultivos a 30°C cada 12 horas para evitar la formación de biopelícula. Pasado 48 horas, las biopelículas de los cultivos a 25 y 30°C se resuspendieron en 1 ml de medio NBAF y se concentraron por centrifugación a 10,000 rpm por 2 minutos, al igual que las células planctónicas. Después, se eliminó el sobrenadante y los paquetes celulares se resuspendieron con 200 μ l de B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent) de Thermo Fisher Scientific. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos para separar la fracción soluble, la cual se transfirió a tubos nuevos y se cuantificó el contenido proteico en el nanodrop considerando $A_{280nm} = 1\text{mg/ml}$ de proteína. El extracto proteico se mezcló con buffer Laemmli y se utilizó 1.0 μ g (para anti-pilA), 10.0 μ g (para anti-OmcS) y 100 μ g (para anti-OmcZ) de proteína total para realizar la electroforesis tipo SDS-PAGE. Posterior a la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia Mighty Small Transfer Tank (Hoefer) en buffer de transferencia (TRIS, glicina, SDS, metanol). La membrana se bloqueó con leche en polvo (Svelty) al 10% en PBS (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.0018 M KH_2HPO_4) toda la noche a 4°C, después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBST (PBS, Tween 0.3%) y otros 3 con PBS. Seguido, se agregó el anticuerpo primario anti-PilA 1:1000, anti-OmcS 1:1000 y anti-OmcZ 1:500 diluidos en PBS-BSA 0.3% y se incubó toda la noche en agitación suave a 4°C. Pasado el tiempo, se repitieron los lavados con PBST y PBS, se agregó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG acoplado a fosfatasa alcalina (Invitrogen) diluido 1:5000 en PBS-BSA 0.3% y se dejó incubando toda la noche en agitación

suave a 4°C. Finalmente se repitieron los lavados con PBST y PBS, y se reveló con 1ml solución BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) por 5 minutos.

La tinción hemo se realizó conforme a lo descrito previamente (Thomas et al., 1976; Francis y Becker, 1984) la siguiente forma: Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de 30 µg de proteína en buffer Laemmli sin β-mercaptoetanol. Al finalizar la electroforesis, el gel se sumergió en 15 ml de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) 6.3 mM (disuelto en metanol) y 35 ml de acetato de sodio 0.25 mM pH 5.0 y se dejó reposando 1 hora en el cuarto oscuro. Pasado ese tiempo, se agregó peróxido de hidrógeno (30mM) y se incubó media hora. Finalmente, se eliminó el exceso de TMB sumergiendo el gel en una solución de isopropanol 30% con acetato de sodio 0.25 mM pH 5.0.

7.5. Determinación de la interacción de GSU1771 con genes específicos.

7.5.1. Purificación de la proteína GSU1771

Se inoculó medio LB (200µg/ml de ampicilina) con 1:100 de un cultivo de toda la noche de *E coli* MC1061/pBAD/His-GSU1771 (Hernández-Eligio et al., 2022) y se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0.4. Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína recombinante con 0.2% de arabinosa y se incubó 4 horas. Al finalizar el tiempo de cultivo, se concentraron las células por centrifugación a 6,000 rpm 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 4 ml de buffer de lisis (PBS + 20mM imidazol + 1mg/ml de lisozima) y se incubó por 30 minutos en hielo. Seguido, las células se lisaron por sonicación dando 5 pulsos de 1 minuto a 200 Hz con dos minutos de descanso entre cada pulso. El lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble. La purificación de la proteína recombinante 6His-GSU1771 se realizó mediante cromatografía de afinidad, usando la resina Ni-NTA de QUIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto soluble se pasó a una columna con 500 µl de resina y se incubó 1 hora a 4°C en agitación suave, pasado el tiempo se abrió el flujo de la columna para dejar pasar la fracción no unida y luego se realizaron lavados de 4 ml con PBS + 40 y 50 mM de imidazol. Finalmente se realizaron 5 eluciones con 500 µl de PBS + 250mM de imidazol y las distintas fracciones se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE (Figura 8 A).

7.5.2. Diálisis y concentración de la proteína GSU1771

Una vez purificada la proteína GSU1771, se concentró y se eliminó el imidazol usando el sistema “Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters” de Amicon. Se colocó el contenido de cada una de las eluciones a una columna con su tubo colector y se centrifugó 5 minutos a 14,000 xg. Posteriormente, se realizaron dos lavados con buffer (HEPES 40nM, KCl 50mM y MgCl 8mM) y se recuperó la proteína concentrada. Finalmente, la proteína se cuantificó en nanodrop y su integridad se verificó en una electroforesis SDS-PAGE (Figura 8 A). La muestra se guardó a 4°C.

7.5.3. Amplificación y purificación de regiones reguladoras

Se realizaron reacciones de PCR como se muestra a continuación, usando los oligonucleótidos listados en la Tabla 3.

Reactivo	Cantidad (µl)
Oligo fw	5
Oligo rv	5
Buffer 10X	5
MgCl ₂	2.5
dNTP's	2.5
DMSO	2.5
ADN molde	2.0
Taq polimerasa	0.3
H ₂ O	25.2

Condiciones de reacción

93°C	3 min	x1
93°C	40 seg	} x30
60°C	40 seg	
72°C	30 seg	
72°C	5 min	x1

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para amplificar regiones reguladoras

Nombre	Secuencia	Referencia
pgcAemsaFw	CGCGCAAACAATTTCAGAC	Andrade et al., 2021
pgcAemsaRv	CCTGAGCGCGTGGTAGTGT	Andrade et al., 2021
gsu1771emsaFw	CGCTGGATCTCCTGAAAGG	Andrade et al., 2021
gsu1771emsaRv	CGCGATACACCCTTACCTT	Andrade et al., 2021
acnAemsaFw	CCGGCATGCGGAGTC	Andrade et al., 2021
acnAemsaRv	CTCTCACCTCACTCCGTTT	Andrade et al., 2021
pulFemsaFw	ACCATCTTCGCATCCCTGTG	Este trabajo
pulFemsaRv	CTCCGAGGAGCCGAGCTTAC	Este trabajo
gsu3356emsaFw	ATCCATGCACTCCATCCTCC	Este trabajo
gsu3356emsaRv	AGGCTTGCTCGTCTCATGTC	Este trabajo
hybSemsaFw	CCACTGAAGGCGTGATTTTCG	Este trabajo
hybSemsaRv	CCCATAAATCCCCCTGTCCG	Este trabajo
relAemsaFw	AGTCGTCGTTCCCGCTAATC	Este trabajo
relAemsaRv	CGAGGATATCGTTGAGCCGT	Este trabajo
omcMemsaFw	CTCCAGCGTAATCAACGGCG	Este trabajo
omcMemsaRv	GGCTATCCTCTCTTTGCGTG	Este trabajo
omcBCemsaFw	AATTCGTCCGGATGTTTGTC	Hernández-Eligio et al., 2022
omcBCemsaRv	AAGTGGACCTCCTTTCTTCATTC	Hernández-Eligio et al., 2022

Las reacciones de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN correspondientes a las regiones reguladoras, se purificaron de gel de agarosa usando el “GeneJet PCR purification kit” de Thermo. Finalmente, los fragmentos purificados se cuantificaron en un nanodrop, la integridad se verificó con una electroforesis en gel de agarosa (Figura 8 B) y las muestras se preservaron a 4°C hasta su uso.

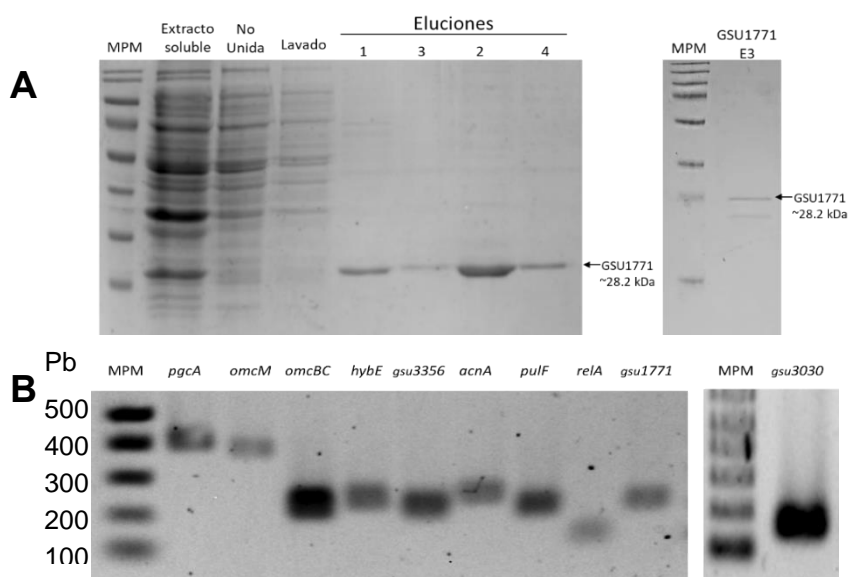


Figura 8. Purificación de la proteína GSU1771 y amplificación de regiones reguladoras para EMSAs. A) Geles de poliacrilamida con las fracciones derivadas de la purificación de GSU1771 (izquierda) y con la proteína purificada y concentrada (derecha). **B)** Gel de agarosa con los fragmentos de ADN generados en la PCR.

7.5.4. Ensayos de interacción ADN-proteína tipo EMSA

Los ensayos de interacción entre las regiones reguladoras de los genes seleccionados y la proteína GSU1771, se realizaron en reacciones como se muestra abajo. Posteriormente se incubaron a 30°C por 30 minutos y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida nativos. Como control

negativo se usó la secuencia gsu303 que corresponde a la región intergénica entre *gsu1704* y *gsu1705* (Hernandez-Eligio et al., 2022).

REACTIVOS	Concentración
ADN Blanco	100 ng
ADN Control negativo	100 ng
HEPES	0.04 M
KCL	0.05 M
MgCl ₂	0.008 M
BSA	0.1 mg/ml
NP-40	0.05 %
DTT	1.0 mM
PROTEÍNA GSU1771	0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 μM
H ₂ O	Para 20μl

7.6. Predicción *in silico* de los posibles sitios de unión de la proteína GSU1771 sobre sus genes blanco

Se analizaron las regiones intergénicas río arriba de los genes *pgcA*, *pulF*, *gsu1771*, *relA*, *hybE*, *acnA*, *omcS*, *omcZ*, *omcE*, *dcuB* y *frdC* en el programa en línea MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), usando el método “Differential Enrichment mode” tomando la secuencia gsu303 y la región promotora de *omcBC* como controles negativos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Perfil transcriptómico de la cepa $\Delta gsu1771$ en condiciones de formación de biopelícula.

8.1.1 Condiciones de formación de la biopelícula en la cepa $\Delta gsu1771$ vs DL1

Con la finalidad de confirmar los fenotipos presentados por la cepa $\Delta gsu1771$ y determinar algunos parámetros (tiempo y temperatura) para la cosecha de las biopelículas, primero se realizó una curva de crecimiento con las cepas DL1 y $\Delta gsu1771$ a 30°C y 25°C en medio NBAF. Las cinéticas de crecimiento a las dos temperaturas de incubación mostraron que la cepa $\Delta gsu1771$ presenta un retraso en el crecimiento, ya que tiene una fase lag más prolongada respecto a la cepa silvestre, aunque hacia la fase estacionaria, alcanza un crecimiento similar a la cepa silvestre (Figura 9), lo que concuerda con lo observado anteriormente (Hernández-Eligio et al., 2022). Para la formación de biopelícula y posterior extracción de ARN, a pesar de que a 30°C se observa un crecimiento mayor, se eligió hacer el ensayo a 25°C ya que a esta temperatura se ha reportado un incremento en la producción de los nanocables y de la formación de biopelícula (Reguera et al., 2005). Por otro lado, se determinó cosechar las biopelículas a las 48 horas, ya que en ese tiempo de incubación se encuentra una buena relación entre biomasa y células viables (Hernández-Eligio et al., 2022). En la Figura 10 se observan las biopelículas de ambas cepas, donde la biopelícula formada por la cepa $\Delta gsu1771$ es más gruesa y resistente que la formada por la cepa DL1.

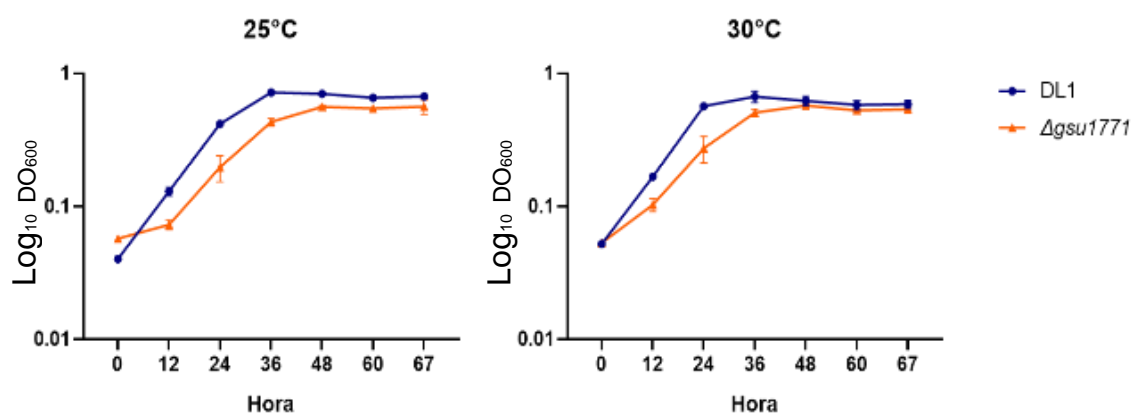


Figura 9. Curvas de crecimiento de *G sulfurreducens* DL1 y $\Delta gsu1771$ en medio NBAF a 25°C y 30°C. Las gráficas fueron realizadas en GraphPad 8.

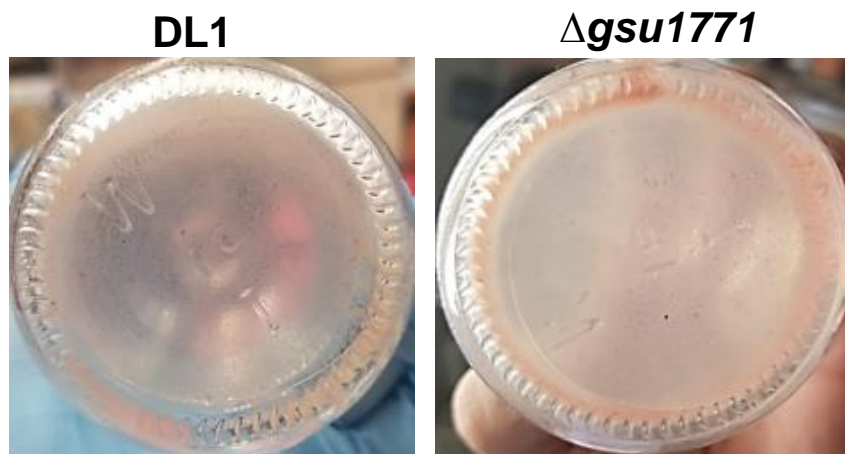


Figura 10. Imágenes de la biopelícula formada por las cepas DL1 y Δ gsu1771. Las biopelículas fueron crecidas en medio NBAF a 25°C por 48 horas.

Para determinar el perfil transcriptómico de la cepa Δ gsu1771 respecto a la DL1 se realizó un análisis de RNA-seq por duplicado para cada condición. Para lo anterior, primero se extrajo ARN de las biopelículas, se eliminó el ADN contaminante, se eliminó el ARN ribosomal, se realizaron las bibliotecas de ADNc y estas se secuenciaron usando la plataforma de Illumina (ver materiales y métodos).

La expresión diferencial entre las dos cepas se determinó analizando el RNA-seq de la cepa Δ gsu1771 respecto a la cepa silvestre en la plataforma IDEAMEX. En la Figura 11 A se muestra el resultado del análisis. Se identificaron 467 genes diferencialmente expresados (DE) con 4 diferentes métodos estadísticos empleados y valores de “p value” < 0.05 y un “Log2 fold change” > 1.5. Estos datos indican que al remover el regulador GSU1771 se altera la expresión del 12.7% del genoma de *G. sulfurreducens* en condiciones de formación de biopelícula (considerando que *G. sulfurreducens* tiene anotados 3672 genes identificados en la base de datos de KEGG).

El total de genes se clasificaron dentro de alguna de las siguientes categorías: síntesis proteica, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de nucleótidos, metabolismo de ADN/ARN, metabolismo de aminoácidos, proteólisis, metabolismo de lípidos, metabolismo de cofactores y vitaminas, metabolismo energético y transporte de electrones, transporte, envoltura celular, funciones

reguladoras y transcripción, transducción de señales, otros y función desconocida (Figura 11 B).

La clasificación de acuerdo al valor de “Log2 fold change” para determinar si es positivo o negativo, determinó que hay 167 genes sobreexpresados y 300 subexpresados en el perfil transcriptómico analizado (Figura 12). Lo cual indica que GSU1771, además de su función como represor transcripcional previamente

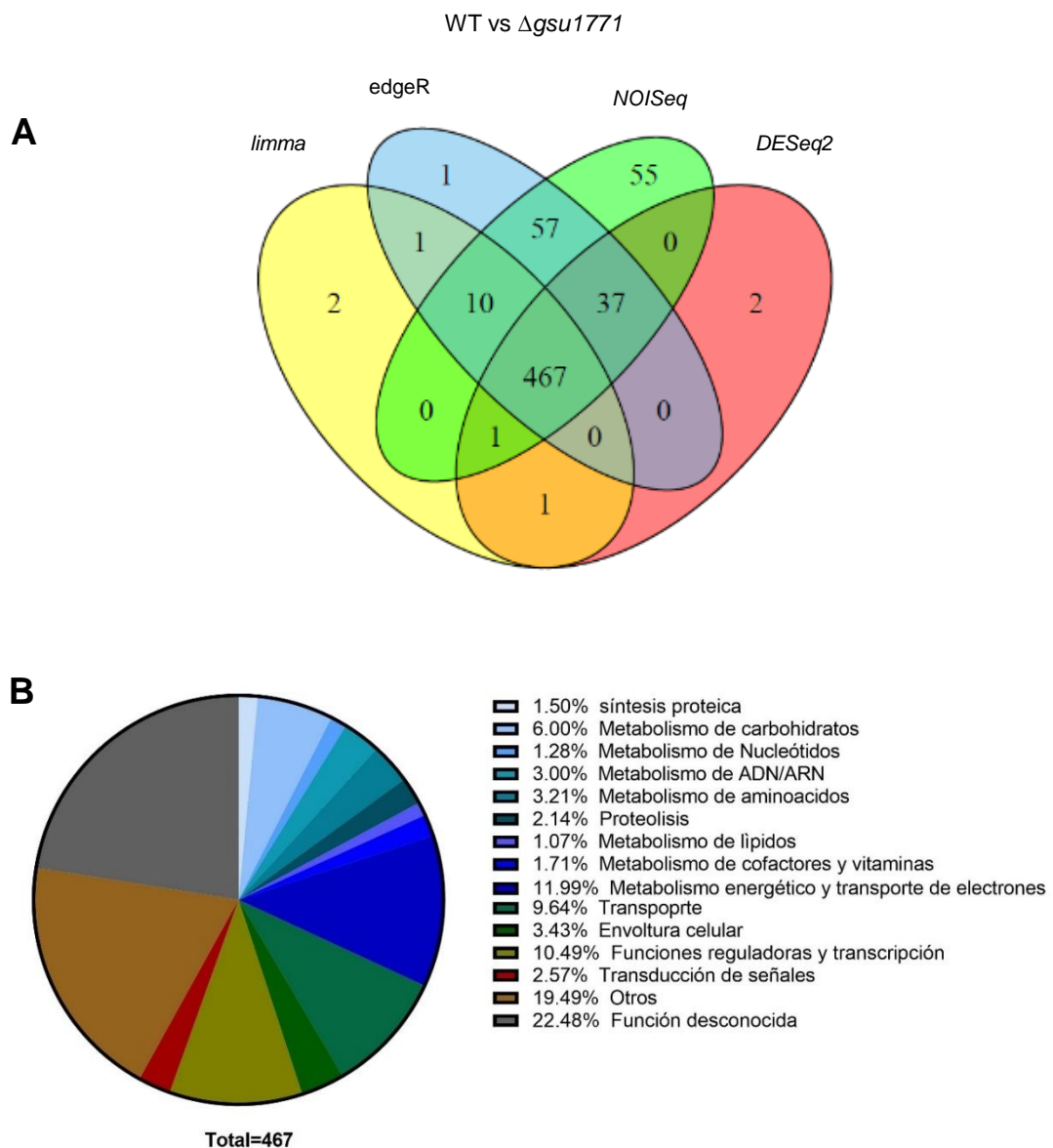


Figura 11. Integración del análisis del transcriptoma en IDEAMEX. A) Diagrama de Venn generado en IDEAMEX del análisis de expresión diferencial en los 4 métodos usados. **B)** Clasificación funcional de los genes DE.

propuesto (Tremblay et al., 2011; Hernández-Eligio et al., 2022), también podría funcionar como activador transcripcional de otros genes.

Las categorías funcionales con mayor cantidad de genes DE fueron: “función desconocida” con un 22.48% y “otros” con un 19.49% (Figura 12). Además de esas dos categorías, las que mayor cantidad de genes DE presentan son: “metabolismo energético y transporte de electrones” con un 11.99%, “funciones reguladoras y transcripción” con 10.49%, “Transporte con 9.64%” y “metabolismo de carbohidratos” con un 6% (Figura 12). Un posterior análisis se enfocó en los genes de estas categorías, debido a que contienen genes necesarios para la formación de biopelícula y la TEE, (Juarez et al., 2009; Reguera et al., 2006; Nevin et al., 2009; Rollefson et al., 2011; Kavanagh et al., 2016; Zhuang et al., 2020)

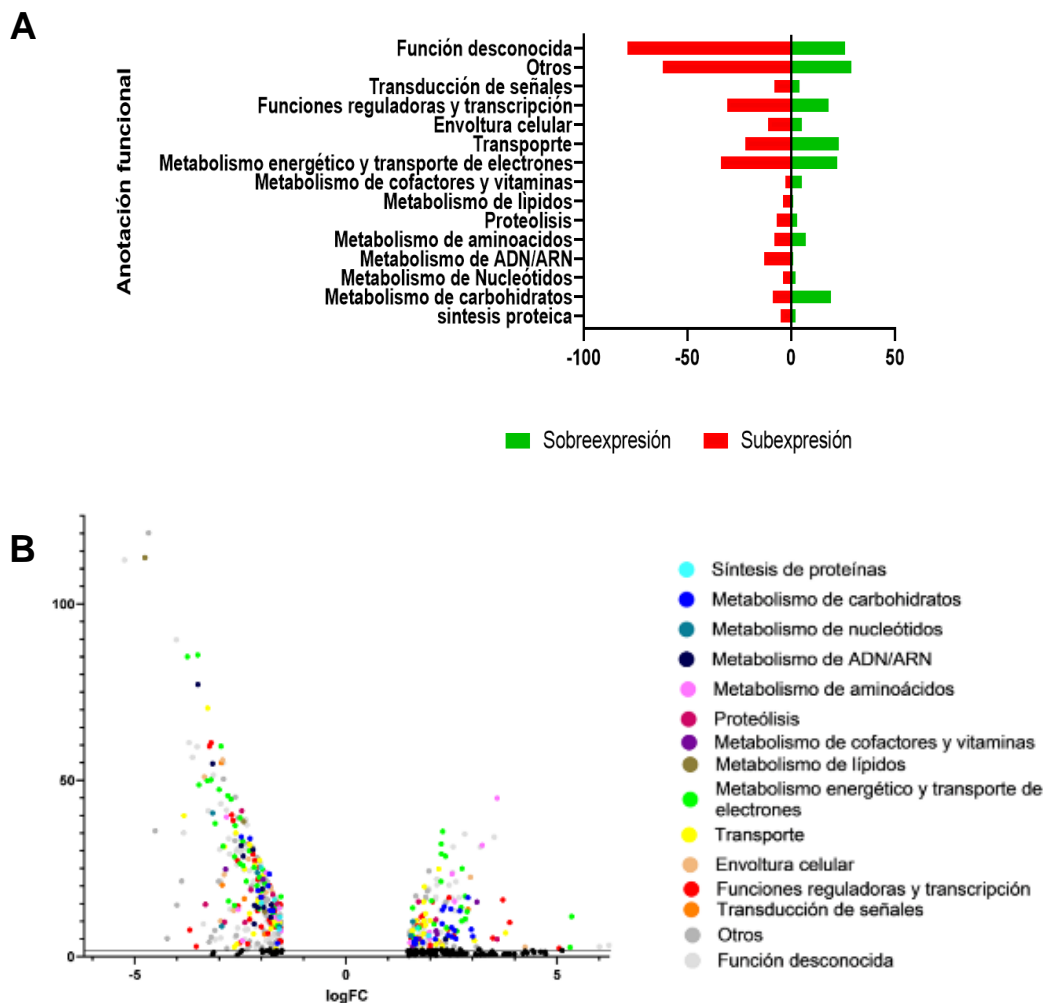


Figura 12. Clasificación del total de genes de acuerdo a su anotación funcional y tipo de regulación representada en **A)** gráfica de barras y **B)** diagrama de vulcano. Las gráficas fueron generadas en “GraphPad Prism 8”.

8.2. Validación del RNA-seq por RT-qPCR

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos del análisis de RNA-seq se procedió a seleccionar algunos genes DE y cuantificar su expresión por RT-qPCR en condiciones de formación de biopelícula (Tabla 4). En el grupo de genes sobreexpresados se seleccionaron: *epsH*, relacionado con la síntesis de exopolisacáridos; *gsu0972*, parte de un transportador ABC; *hybA*, *pgcA* y *omcM*, del metabolismo energético; *aroG* y *panC*, con funciones en vías metabólicas y; *gnfK* y *gsu2507*, que codifican HK (Tabla 4, genes en verde). Cabe destacar que *gnfK* está DE en 3 de los 4 métodos usados, pero se incluyó en el análisis de expresión para considerar los genes que se encuentran DE en 3 de 4 métodos en análisis posteriores. En el grupo de genes subexpresados se seleccionaron: *acnA*, una enzima del ciclo de Krebs; *ato-I*, del metabolismo de ácidos grasos; *gsu0810*, una proteína de membrana; *dcuB*, un transportador de fumarato; *pilA*, la geopilina; *ppcD*, un citocromo tipo-c; *csrA*, un regulador de unión a ARN y; *gsu3356* que es una diguanilato ciclasa (Tabla 4, genes en rojo).

Los resultados obtenidos en la RT-qPCR siguen la misma tendencia que lo observado en el transcriptoma (Tabla 4), por lo que los datos del transcriptoma son reproducibles por esta otra técnica.

8.3. Genes DE, relacionados con la formación de biopelícula y la TEE

Una vez clasificados el total de genes DE por categoría funcional y realizado la validación por RT-qPCR de algunos de estos, se procedió a realizar el análisis por grupos de genes con funciones que puedan estar relacionadas con la formación de biopelícula más gruesa y la TEE más eficiente de la cepa Δ gsu1771 respecto a la silvestre (Hernández-Eligio et al., 2022).

Tabla 4. Genes DE en el transcriptoma y validados por RT-qPCR

Locus Tag	Nombre	Anotación	Definición	Log ₂	Validación por qPCR $2^{\Delta\Delta CT}$
<i>gsu1979</i>	<i>epsH</i>	Metabolismo de carbohidratos	Proteína de síntesis de exopolisacáridos (exosortasa)	2.116	98.87
<i>gsu0972</i>	-	Transporte	ATPasa AAA, motivo firma de Transportador ABC	2.196	10.19
<i>gsu0783</i>	<i>hybA</i>	Metabolismo energético y transporte de electrones	Hidrogenasa de membrana	2.256	27.58
<i>gsu1761</i>	<i>pgcA</i>	Metabolismo energético y transporte de electrones	Lipoproteína, citocromo tipo-c	2.029	22.5
<i>gsu2294</i>	<i>omcM</i>	Metabolismo energético y transporte de electrones	Citocromo tipo-c de membrana externa	5.309	67.18
<i>gsu3142</i>	<i>aroG</i>	metabolismo de aminoácidos	3-desoxi-D-arabino-heptuloseonato 7-fosfato sintasa	3.227	36.5
<i>gsu1706</i>	<i>panC</i>	Metabolismo de cofactores y vitaminas	Pantoato β-alanina ligasa	2.134	13.9
<i>gsu0941</i>	<i>gnfK</i>	Función reguladora y transcripción	Sensor Histidina cinasa	3.151	20.81
<i>gsu2507</i>	-	Función reguladora y transcripción	Sensor Histidina cinasa	2.054	5.97
<i>gsu0846</i>	<i>acnA</i>	Metabolismo de carbohidratos	Aconitato hidrolasa I	-2.019	0.96
<i>gsu0490</i>	<i>ato-I</i>	Metabolismo de lípidos	Succinil:acetato coenzima A transferasa	-2.423	0.89
<i>gsu0810</i>	-	Envoltura celular	Proteína de membrana externa con Dominio OMP_b-brl y OmpA	-2.922	0.5
<i>gsu2751</i>	<i>dcuB</i>	Transporte	Antiportador anaeróbico de C4-Dicarboxilato, familia DcuB	-2.606	0.69
<i>gsu1496</i>	<i>pilA</i>	Metabolismo energético y transporte de electrones	Geopilina	-2.137	0.46
<i>gsu1024</i>	<i>ppcD</i>	Metabolismo energético y transporte de electrones	Citocromo tipo-c	-3.095	0.3
<i>gsu3041</i>	<i>csrA</i>	Función reguladora y transcripción	Proteína de unión a ARN	-3.696	0.43
<i>gsu3356</i>	-	Transducción de señales	Diguanilato ciclase con dominio HAMP	-2.074	0.74

Tabla 5. Genes con función putativa en la producción de exopolisacáridos, sobreexpresados en la cepa Δ gsu1771

LocusID	Nombre	Anotación	Definición	Log ₂ FC	pval
<i>gsu1958</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Proteína con dominio polisacárido desacetilasa	3.0042132	1.74E-06
<i>gsu1959</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Proteína de biosíntesis de exopolisacáridos, putativa	2.4206052	8.29E-07
<i>gsu1961</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Glicosiltransferasa	2.6016857	7.72E-06
<i>gsu1962</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Glicosiltransferasa	2.5010731	1.97E-06
<i>gsu1963</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Flipasa undecaprenil-difosfo-oligosacárido (similar a RfbX de la familia Wzx)	2.5726142	3.86E-08
<i>gsu1970</i>	<i>neuB</i>	Metabolismo de carbohidratos	N-acetilneuraminato sintasa	2.28764	5.46E-14
<i>gsu1972</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	N-acetilneuraminato citidiltransferasa	2.6962605	1.12E-13
<i>gsu1973</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Aciltransferasa / NeuD NnaD	2.5041665	5.69E-09
<i>gsu1975</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Epimerasa dependiente de NAD	2.8911481	1.99E-17
<i>gsu1976</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Glicosiltransferasa, parecido a la familia YqgM	2.3335085	6.15E-15
<i>gsu1977</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Glicosiltransferasa, parecida a la subfamilia CESA	2.4860608	3.20E-14
<i>gsu1978</i>	<i>epsI</i>	Metabolismo de carbohidratos	Proteína periplásmica de síntesis de exopolisacáridos "I"	2.9682019	1.93E-08
<i>gsu1979</i>	<i>epsH</i>	Metabolismo de carbohidratos	Proteína de membrana de síntesis de exopolisacáridos "H"	2.1162614	1.14E-05
<i>gsu1980</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Polisacárido desacetilasa con dominio DUF3473.	2.2773529	4.71E-10
<i>gsu1892</i>	<i>kdsC</i>	Metabolismo de carbohidratos	3-deoxi-D-mano-octulosonato-8-fosfato fosfatasa.	1.6246396	6.04E-05
<i>gsu1952</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Glicosiltransferasa, putativa	1.653185	0.0002046
<i>gsu1965</i>	-	Metabolismo de carbohidratos	Proteína con dominio relacionado a polisacárido-piruvil transferasa.	1.613406	0.0001496
<i>gsu1985</i>		transporte	Proteína periplásmica se síntesis o exporste de polisacáridos.	1.8843347	6.56E-13
<i>gsu0991</i>		Envoltura celular	Glicosiltransferasa, parecido a la familia ExpC	2.948461	3.01E-23

8.3.1. Genes involucrados en la producción de exopolisacáridos

Dentro de los genes DE, observamos un grupo de genes sobreexpresados que, por datos de homología con otros genes obtenidos del KEGG, se predice que están involucrados en la producción de exopolisacáridos (Tabla 5). La función de los exopolisacáridos en la matriz extracelular de las biopelículas se ha estudiado ampliamente; estos le permiten a la célula adherirse a superficies abióticas y entre ellas, fomentando la agregación celular. Además, cumplen un papel estructural dentro de la arquitectura de la biopelícula interactuando con los demás componentes de la matriz extracelular (Limoli et al., 2015; Rathinam y Sani, 2019).

En bacterias se han descrito tres vías de producción de exopolisacáridos: dependiente de Wzx/Wzy, de transportador ABC y de sintasa (Schmid et al., 2015). En la primera vía, las enzimas llamadas glicosiltransferasas forman tetrapeptidos de azúcares que luego son polimerizados y secretados por el sistema Wzx/Wzy; en la segunda vía las glicosiltransferasas forman el polímero de azúcares y un transportador ABC los exporta fuera de la célula, y en la última vía, una enzima llamada sintasa forma un polímero de azúcares que salen directamente al medio extracelular a través de una proteína con estructura de barril- β (Schmid et al., 2015). En *G. sulfurreducens* ya se ha descrito una vía de secreción de exopolisacáridos perteneciente a la vía dependiente de transportador ABC que está codificada río abajo del clúster que codifica al *geopili* (Rollefson et al., 2011; Zhuang et al., 2020).

Entre los genes con función putativa de síntesis de exopolisacáridos, se encuentra *gsu1963*, que codifica una flipasa, la cual tiene homología con RfbX (de la familia Wzx) que se encarga de formar el antígeno O en otras bacterias (Schmid et al., 2015). También se identificó el gen *gsu1842*, un homólogo a una proteína Wzy de *G. metallireducens* (Schmid et al., 2015), que, aunque no está DE, podría participar en una vía de síntesis de exopolisacáridos junto a *gsu1963*.

Otro gen interesante es *gsu1985* el cual codifica una proteína que contiene un dominio relacionado a la síntesis y/o transporte de exopolisacáridos y que al hacer un alineamiento tipo Blast, alinea con transportadores de exopolisacáridos tipo ABC, por lo que podría pertenecer a otra vía de síntesis de exopolisacáridos. Complementando lo anterior, también se encuentran los genes *gsu1959*, *gsu1961*, *gsu1962*, *gsu1976*, *gsu1977*, *gsu1952* y *gsu0991* los cuales codifican glicosiltransferasas putativas que, como se mencionó previamente, son esenciales para la síntesis de exopolisacáridos (Schmid et al., 2015).

El gen *epsH* codifica una proteína con varios dominios transmembranales denominada exosortasa, similar a la que encontramos en *Methylobacillus sp*, la cual participa en la producción del exopolisacárido metanolan (Yoshida et al., 2003; Haft et al., 2006). Este gen está fusionado río abajo con *epsI* el cual se ha propuesto que forma el dominio C-terminal de la exosortasa posicionado en el periplasma y, aunque ambos participan en la producción del exopolisacárido, no son esenciales (Yoshida et al., 2003; Haft et al., 2006). Estas proteínas, además podrían tener participación en el transporte y clasificación (sorting) de proteínas a través de la membrana, ya que EpsH tiene un dominio transpeptidasa que estaría reconociendo y eliminando un péptido señal con el motivo denominado PEP-CERM y así la proteína puede ser incorporada a la matriz de exopolisacáridos (Haft et al., 2006). Se requiere estudiar estas proteínas en *G. sulfurreducens* para confirmar si tienen un papel en el transporte de exopolisacáridos y/o proteínas.

Otros genes identificados son: *neuB*, *gsu1972* y *gsu1973*, que están involucrados en la síntesis de N-acetilneuraminato, el cual es un ácido siálico (monosacárido ácido). En *Haemophilus influenzae* no tipificable, la eliminación de genes que sintetizan ácido siálico disminuye significativamente la producción de biopelícula (Jurcisek et al., 2005). En *G. sulfurreducens* no se ha caracterizado esta vía de síntesis de exopolisacáridos, pero recientemente se ha reportado que una mutación en *neuB* afecta drásticamente la formación de biopelícula (Cologgi et al., 2021).

Otro gen identificado es *kdsC*, el cual codifica para una enzima que participa en la síntesis del azúcar KDO (ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosónico) esencial

para la producción de lipopolisacáridos (LPS) (Cipolla et al., 2009). En *G. sulfurreducens* los LPS promueven la interacción célula-célula, así como la interacción con minerales que son procesos que participan en la formación de biopelícula y la TEE, además de formar una barrera protectora contra cationes metálicos tóxicos (Clark et al., 2021).

Dentro de este grupo de genes relacionados a la síntesis de exopolisacáridos, están *gsu1958* y *gsu1980*, que codifican proteínas pertenecientes a la familia “polisacárido desacetilasa”. La desacetilación de los polisacáridos es un proceso necesario para su maduración y correcto posicionamiento en la pared celular, procesos necesarios durante la formación de biopelícula (Ostapska et al., 2018; Chepkwony y Brun., 2021).

El haber encontrado genes sobreexpresados que codifican proteínas involucradas en vías putativas de síntesis de exopolisacáridos en la cepa Δ *gsu1771* de *G. sulfurreducens*, es de gran interés ya que una sobreproducción de exopolisacáridos se refleja en un aumento de la TEE, gracias a que promueve la formación de una biopelícula más gruesa con un mayor porcentaje de células viables y de citocromos tipo-c fijados en la matriz extracelular (Rollefson et al., 2011; Zhuang et al., 2020).

8.3.2. Genes involucrados en el transporte

Otro grupo de genes cuya expresión se incrementó en la biopelícula de la cepa Δ *gsu1771* son aquellos involucrados en sistemas de transporte (Tabla 6). Entre estos genes están dos subunidades de una de las cuatro bombas de eflujo de metales pesados RND que tiene *G. sulfurreducens* codificados en su genoma y que está involucrada en la detoxificación de Co(II) (Dulay et al., 2020). Además, encontramos genes que codifican proteínas pertenecientes a un sistema de secreción tipo II, el cual participa en la secreción de proteínas esenciales en la reducción de Fe(III) y Mn(IV) insolubles, principalmente la proteína multi-Cu OmpB (Outer membrane protein B) (Mehta et al., 2006). Ambos sistemas de secreción, se encontraron desregulados positivamente en la biopelícula de *G. sulfurreducens* crecida sobre un electrodo de carbono en una celda microbiana de combustible (Kavanagh et al., 2016) por lo que podrían ser necesarios para los fenotipos observados por la cepa Δ *gsu1771*.

Tabla 6. Genes que codifican transportadores y que están sobreexpresados en la cepa *Δgsu1771*

Locus ID	Nombre	Definición	Log2 fold change
Sistemas de secreción tipo I (SSTI)			
<i>gsu2135</i>	-	Proteína de membrana interna de la bomba de eflujo RND.	2.380
<i>gsu2136</i>	-	Proteína de fusión de membrana de la bomba de eflujo RND.	3.782
Sistemas de secreción tipo II (SSTII)			
<i>gsu1777</i>	<i>pulG</i>	Pseudopilina "PulG" del SSTII.	2.132
<i>gsu1779</i>	<i>pulP</i>	Proteína "PulP" del SSTII.	2.286
<i>gsu1778</i>	<i>pulQ</i>	Lipoproteína "PulQ" del SSTII	1.597
<i>gsu1784</i>	<i>pulF</i>	Proteína de membrana interna "PulF" del SSTII	1.764
Transportadores tipo ABC			
<i>gsu1279</i>	<i>nikMN</i>	Proteína de membrana NikMN del transportador ABC de níquel.	2.391
<i>gsu1346</i>	<i>cysP</i>	Proteína periplásmica de unión a sulfato del transportador ABC de sulfato.	3.046
<i>gsu1774</i>	<i>ftsX</i>	Proteína de membrana de transportador ABC de división celular, FtsX, putativa.	2.301
<i>gsu1922</i>	<i>lptF</i>	Proteína de membrana LptF del transportador de lipopolisacárido tipo ABC.	1.740
<i>gsu1923</i>	<i>lptG</i>	Proteína de membrana LptG del transportador de lipopolisacárido tipo ABC.	1.638
<i>gsu0972</i>	-	ATPasa de la familia AAA / Motivo firma de transportador tipo ABC.	2.196
<i>gsu1262</i>	-	Proteína de membrana putativa.	2.165
<i>gsu1528</i>	-	Proteína periplásmica de unión a sustrato perteneciente a transportador ABC.	1.837
<i>gsu1900</i>	-	Proteína de membrana con función desconocida DUF140 de transportador ABC.	1.546
<i>gsu0815</i>	-	Proteína periplásmica de unión a sustrato de la familia MCE, perteneciente a transportador ABC.	1.561

Otro grupo de genes relevantes en esa categoría, son los que codifican transportadores tipo ABC. Estas proteínas participan en el transporte a través de la membrana de una amplia gama de moléculas, ya sea hacia adentro, como nutrientes que no pueden pasar por difusión simple, como hacia fuera de la célula, por ejemplo, componentes de membrana externa y elementos de la matriz extracelular (Davidson y Chen, 2004; Schmid et al., 2015). En *G. sulfurreducens* la expresión de este tipo de transportadores aumenta durante la formación de biopelícula lo que podría indicar que son necesarios para el transporte de elementos de la matriz extracelular (Nevin et al., 2009; Kavanagh et al., 2016). Un ejemplo de estos transportadores es el codificado por el gen *gsu1501*, que forma parte de un transportador ABC que secreta exopolisacáridos de la matriz extracelular (Rollefson et al., 2011; Zhuang et al., 2020). En este trabajo identificamos los genes *lptF* y *lptG*, codifican proteínas transmembranales que junto a *lptB* (que codifica una ATPasa) forman un transportador ABC (llamado LptB₂FG); este transportador se encarga de escindir los lipopolisacáridos de la

membrana interna y así puedan seguir su trayecto hasta la membrana externa a través de los demás componentes de este sistema de transporte (Sperandeo et al., 2017).

Por otro lado, observamos que el gen *dcuB* que codifica para un transportador de fumarato, se encuentra subexpresado. Esto concuerda con lo que previamente ya se había reportado; en estudios en biopelícula en celdas microbianas de combustible (Nevin et al., 2009). Sin embargo, se ha observado que, durante el crecimiento planctónico, este gen se sobreexpresa en la cepa mutante Δ *gsu1771* (Hernández-Eligio et al., 2022).

8.3.3. Genes que codifican citocromos tipo-c y el *geopili*

Los citocromos se han estudiado ampliamente en *Geobacter* debido a su papel fundamental en la TEE (Reguera y Kashefi, 2019). En el análisis de RNA-seq de la cepa Δ *gsu1771* vs DL1, se observó que 20 genes que codifican citocromos tipo-c se encuentran DE: 7 sobreexpresados y 13 subexpresados (Tabla 7).

Dentro de los genes sobreexpresados que codifican citocromos tipo-c están: *omcM*, el cual se expresa durante el crecimiento con Fe(III) insoluble, y en estudios recientes se observó que también podría estar involucrado en la reducción extracelular de Pd(II) (Aklujkar et al., 2013; Hernandez-Eligio et al., 2020), *gsu2808* que se le han descrito las mismas características que *omcM* (Methe et al., 2005; Hernandez-Eligio et al., 2020), *gsu2937* también es inducido en presencia de Pd(II) (Hernandez-Eligio et al., 2020), *pgcA* codifica un citocromo extracelular involucrado en la reducción de Fe(III) y Mn(IV) (Tabla 1), *cydA* que forma parte del operón *cydAB* cuya función en bacterias fijadoras de nitrógeno es remover el oxígeno para evitar la inhibición de la nitrogenasa (Juty et al., 1997), *gsu2495* que codifica un citocromo periplásmico con 26 grupos hemo cuya expresión también aumenta durante el crecimiento con óxidos de Fe(III) (Aklujkar et al., 2013) y *gsu3615* que aumenta su expresión en presencia de acetato (Mollaei et al., 2021).

Entre los genes que codifican citocromos y que están subexpresados en la cepa Δ *gsu1771*, se encuentran: *ppcD* que codifica un citocromo periplásmico que participa en el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP (Tabla

1); *sco*, *coxA* y *coxC* que forman parte del operón que codifica el citocromo c oxidasa que podría servir en la aerotolerancia (Methe et al., 2003; Lin et al., 2004); *macA* es un citocromo periplásmico requerido para la reducción de óxido de Fe(III) y citrato Fe(III) cuya expresión se induce por óxido de Mn(IV) (Aklujkar et al., 2013; Butler., 2004); *gsu0746* codifica un citocromo p50 homólogo al de los metanótrofos cuya expresión puede ser inducida por el estrés oxidativo y nitrosativo (Aklujkar et al., 2013).

Por otro lado, el transcriptoma mostró que ninguno de los citocromos cuya expresión se incrementa durante el crecimiento planctónico en la cepa Δ *gsu1771* (Hernández-Eligio et al., 2022), tiene el mismo comportamiento durante la formación de biopelícula, lo que indica que la regulación de esos genes y probablemente la de muchos otros sea diferente en ambas condiciones ya que son estados fisiológicos totalmente diferentes (Flemming et al., 2016).

El contenido de citocromos tipo-c en la biopelícula se determinó mediante una tinción hemo (ver materiales y métodos). El resultado mostró que hay un aumento en el contenido de citocromos en la cepa Δ *gsu1771* respecto a la silvestre y este aumento es incluso mayor que el observado en células planctónicas (Figura 13 A). De acuerdo a su peso molecular, las bandas observadas podrían corresponder con los citocromos: PgcA de ~50kDa (Smith et al., 2014), GSU3615 de ~37.39 kDa (calculado en https://web.expasy.org/compute_pi/), GSU2495 de ~69.68 kDa y GSU2937 de ~35.27 kDa (Methe et al., 2003), los cuales están sobreexpresados en el transcriptoma de la cepa Δ *gsu1771* durante la formación de biopelícula. También

Tabla 7. Genes que codifican citocromos tipo-c regulados por GSU1771

LocusID	Nombre	Anotación	Log2 fold change	pval
Sobreexpresados				
<i>gsu2294</i>	<i>omcM</i>	Citocromo-c de membrana externa	5.309336832	0.002268992
<i>gsu1761</i>	<i>pgcA</i>	Lipoproteína, citocromo tipo-c	2.029368617	1.56E-16
<i>gsu1640</i>	<i>cydA</i>	citocromo bd menaquinol oxidasa, subunidad I	2.253537567	4.62E-22
<i>gsu3615</i>		Citocromo tipo-c	2.625252768	5.99E-08
<i>gsu2495</i>		Citocromo tipo-c	1.571682899	1.18E-06
<i>gsu2808</i>		Lipoproteína, citocromo tipo-c	1.728193752	6.80E-09
<i>gsu2937</i>		Citocromo tipo-c	1.581663838	1.48E-14
Subexpresados				
<i>gsu1024</i>	<i>ppcD</i>	Citocromo tipo-c	-3.09545129	1.66E-38
<i>gsu0218</i>	<i>sco</i>	Citocromo c oxidasa, tipo coo3	-2.62244965	6.61E-38
<i>gsu0219</i>	<i>coxA</i>	Citocromo c oxidasa, tipo coo3, sub unidad I	-2.72326866	2.24E-45
<i>gsu0220</i>	<i>coxC</i>	Citocromo c oxidasa, tipo coo3, subunidad III	-1.62805498	2.05E-09
<i>gsu0466</i>	<i>macA</i>	Citocromo c peroxidasa	-2.50025453	5.09E-40
<i>gsu0746</i>		Citocromo p460, sitio de unión a 1 grupo hemo.	-2.50318842	4.08E-27
<i>gsu1740</i>		Citocromo tipo-c, sitio de unión a 1 grupo hemo	-2.77900104	1.80E-16
<i>gsu0068</i>		Citocromo tipo-c	-2.63855681	4.13E-29
<i>gsu2724</i>		Citocromo tipo-c	-1.64108364	6.56E-15
<i>gsu2743</i>		Citocromo tipo-c, sitio de unión a 1 grupo hemo	-1.93123714	1.48E-21
<i>gsu2811</i>		Citocromo tipo-c	-1.97042532	2.26E-25
<i>gsu3259</i>		Citocromo tipo-c	-1.61110739	4.41E-15
<i>gsu0593</i>		Citocromo b, putativo	-1.71748981	1.25E-12

los tamaños podrían corresponder a: OmcB de ~85.5 kDa, OmcC ~88.9 kDa (Leang et al., 2003), OmcE de ~30 kDa (Mehta et al., 2005), OmcS de ~45 kDa y las dos isoformas de OmcZ de 50 y 30 kDa. Para corroborar la sobreproducción de citocromos que no se encuentran DE en el transcriptoma, se realizó la inmunodetección de OmcS y OmcZ (Figura 13 B) en donde se observa que estos citocromos son más abundantes en la cepa $\Delta gsu1771$ que en la DLI en condiciones de formación de biopelícula. Dichos citocromos aumentan su expresión durante el crecimiento en estado planctónico en la cepa mutante (Hernández-Eligio et al., 2022). Por lo que se podrían acumular en etapas tempranas de la formación de biopelícula, y disminuir su transcripción durante la etapa en que cosechamos las biopelículas, o bien podría haber un mecanismo de regulación traduccional que aumente la producción de estas proteínas. Respecto a OmcZ, la forma activa de este citocromo (OmcZs), también es más abundante en la mutante $\Delta gsu1771$. Esto podría deberse a que el gen *ozpA*, que codifica la enzima que procesa a OmcZL para formar OmcZs (Ki et al., 2021), se encuentra sobreexpresado.

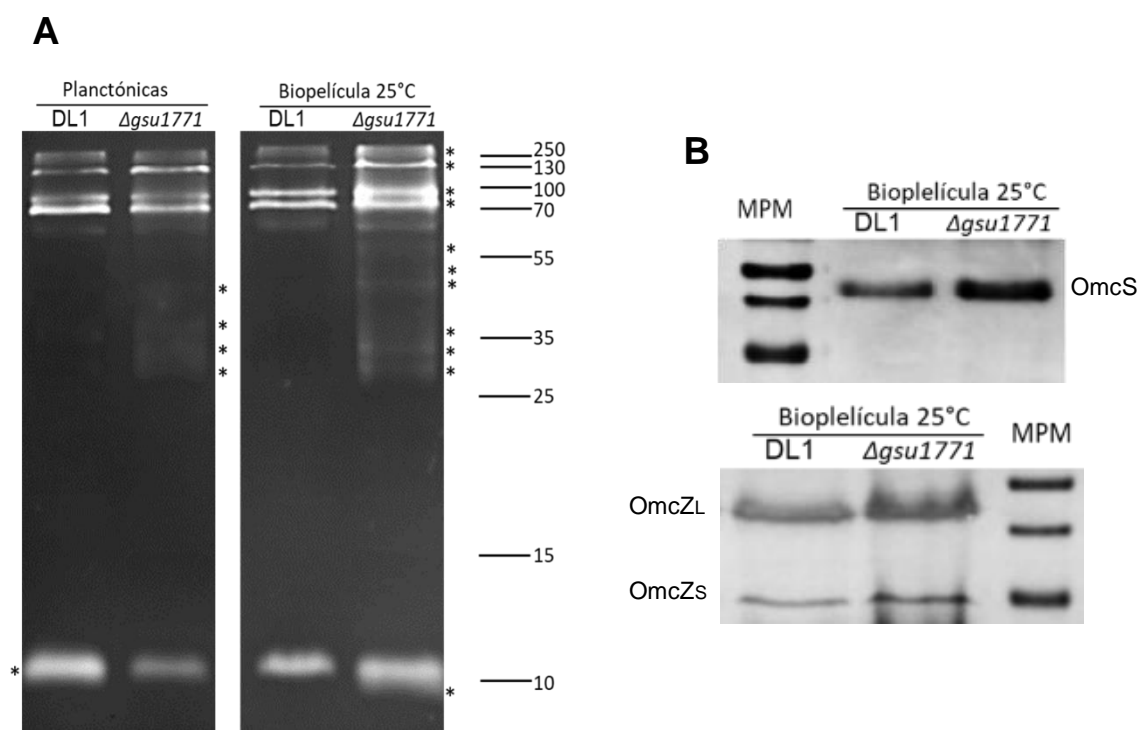


Figura 13. Contenido de citocromos tipo-c de las cepas de *G. sulfurreducens* DL1 y $\Delta gsu1771$. **A)** Tinción hemo en estado planctónico a 30°C y biopelícula en vidrio a 25°C. **B)** Detección por Western Blot de los citocromos OmcS y OmcZ. Los SDS-PAGE del control de carga se encuentra en la Figura S1.

Debido a las características observadas en la cepa $\Delta gsu1771$ y la información que teníamos hasta ahora sobre el regulador GSU1771 (Tremblay et al., 2011; Hernández-Eligio et al., 2022), se esperaba que en condiciones de formación de biopelícula, el geopili estaría sobreexpresado en el transcriptoma. Sin embargo, *pilA* que codifica la subunidad principal del geopili, está subexpresado en la mutante $\Delta gsu1771$. Para comprobar el contenido de la proteína PilA, se realizó una inmunodetección tipo western blot con los extractos proteicos obtenidos de la biopelícula en las mismas condiciones usadas para el transcriptoma, además de biopelículas crecidas a 30°C y células planctónicas. En la Figura 14 se muestra que, en células planctónicas, existe un mayor contenido de PilA en la cepa $\Delta gsu1771$ que en la cepa silvestre, de manera similar a lo observado en trabajos anteriores (Hernández-Eligio et al., 2022). En las biopelículas a 30°C, se observa una disminución de PilA en la cepa $\Delta gsu1771$ respecto a la silvestre y, en las mismas condiciones del RNA-seq, el contenido de PilA es similar en ambas cepas, lo que sugiere que debe haber algún tipo de regulación traduccional que mantiene la cantidad de PilA a pesar de una menor transcripción. Además, como podemos observar en la Figura 14, la cantidad de PilA varía en la cepa $\Delta gsu1771$ al cambiar las condiciones, por lo que evaluar la formación de biopelícula bajo otras variables, nos ayudaría a esclarecer cómo es que se regula el geopili en la cepa $\Delta gsu1771$.

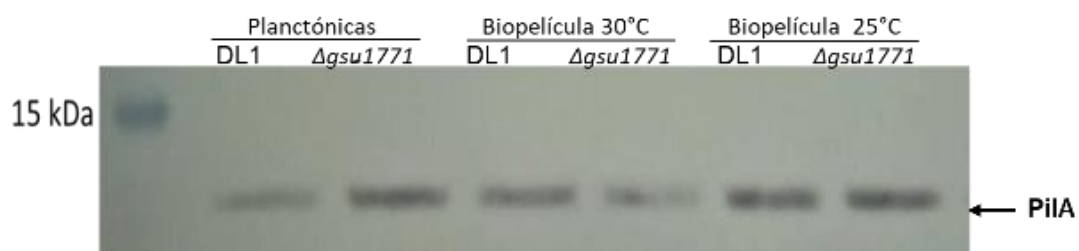


Figura 14. Análisis de la expresión de PilA por Western blot.
El SDS-PAGE de control de carga se encuentra en la Figura S2.

8.3.4. Genes que codifican hidrogenasas

Dentro del grupo de genes DE en el análisis del RNA-seq de la categoría funcional “Metabolismo energético y transporte de electrones” identificamos los que codifican para hidrogenasas. *G. sulfurreducens* tiene la característica de

poder usar H₂ como donador de electrones durante la reducción de óxido de Fe(III) (Caccavo et al., 1994) y tiene 4 clusteres que codifican estas proteínas: *hya* e *hyb*, que son hidrogenasas membranales con sitios catalíticos periplásmicos y *hox* y *mvh*, que son hidrogenasas periplásmicas (Coppi, 2005).

De estos clústeres, *hyb* quien es responsable de la reducción de Fe(III), antraquinona-2,6-disulfonato dependiente de H₂ (Coppi et al., 2004) y está sobreexpresado en el transcriptoma mientras *hya* quien está relacionado con la protección ante el estrés oxidativo y cuya expresión puede proteger a *hyb* de la inactivación causada por el O₂ (Tremblay y Lovley, 2012) está subexpresado.

Estos resultados indican que la respiración dependiente de H₂ como donador de electrones, se estaría favoreciendo en la biopelícula de la cepa Δ *gsu1771*. Por otro lado, la protección al estrés oxidativo podría estar afectada debido a la subexpresión de *hya* además de los genes que codifican el citocromo c oxidasa quien cumple una función similar.

8.4. Genes con función regulatoria DE en el transcriptoma

8.4.1 Genes que participan en la regulación por di-GMPc y sistemas de Dos Componentes

El di-GMPc es uno de los principales segundos mensajeros en bacterias. Esta molécula participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos, entre ellos la formación de biopelícula (Romling et al., 2013). Las diguanilato ciclasas son las enzimas con el dominio GGDEF cuya función es sintetizar o degradar este segundo mensajero (Romling et al., 2013). *G. sulfurreducens* tiene codificado en su genoma 29 de estas enzimas, algunas de las cuales han sido estudiadas en nuestro grupo de trabajo (Huerta-Amparán., 2021). En el transcriptoma estudiado en este trabajo, se encuentra el gen *gsu0895*, el cual codifica una proteína con actividad diguanilato ciclasa que posee los dominios PocR-GAF-GGEEF y está sobreexpresado en la cepa Δ *gsu1771* lo que podría favorecer la formación de biopelícula, ya que este gen es necesario en estas condiciones de crecimiento (Huerta-Amparán., 2021). Por otro lado, se encuentran subexpresados los genes *gsu1037*, *gsu1937*, *gsu3356*, *gsu1400*, y *gsu2044*, los cuales también codifican diguanilato ciclasas. El gen *gsu1037* codifica una diguanilato ciclasa verdadera con los dominios Rec-GGDEF-EAL y aunque este gen aumenta su expresión más de 20 veces en condiciones de formación de

biopelícula en la cepa DL1, la subexpresión de este gen en la cepa *Δgsu1771* podría favorecer la formación de biopelícula ya que en la mutante *Δgsu1037*, aumenta la aglutinación celular; el gen *gsu1937* también tiene actividad diguanilato ciclasa y tiene los dominios 1TM-Tar-HAMP-GGDDF, su expresión aumenta ~4 veces en estado de biopelícula y en una cepa mutante en este gen, disminuye la aglutinación celular (Huerta-Amparán., 2021). Por su parte, los genes *gsu3356* y *gsu1400* aumentan su expresión 3 y 4 veces, respectivamente, en condiciones de formación de biopelícula (Huerta-Amparán., 2021). Sin embargo, no se ha verificado si las proteínas que codifican son diguanilato ciclasas verdaderas; finalmente *gsu2044* disminuye su expresión en formación de biopelícula, por lo que probablemente su expresión no sea necesaria en estas condiciones (Huerta-Amparán., 2021).

En *G. sulfurreducens* no existe mucha información relacionada a las diguanilato ciclasas y se necesitan más estudios para comprender su función en la formación de biopelícula y en la TEE.

Por otro lado, el gen *gsu2236* se encuentra sobreexpresado en la cepa *Δgsu1771*. Este gen codifica una proteína homóloga de RelA, también llamado factor estricto que interactúa con los ribosomas y a partir de GTP y ATP sintetiza (p)ppGpp (guanosin pentafofato), molécula de señalización cuyo efecto promueve la supervivencia de la célula en condiciones de limitación de nutrientes, principalmente de aminoácidos (Starosta et al., 2014). En *Streptococcus mutans*, la inactivación de *relA* afecta considerablemente la formación de biopelícula (Lemos et al., 2004) y en *G. sulfurreducens* la mutación de este gen mediante la inserción de un “cassete” de kanamicina, provoca una deficiencia en la reducción de Fe(III) y en la aglutinación (DiDonato et al., 2006).

Otro grupo de genes DE en el transcriptoma son los correspondientes a sistemas de Dos Componentes, con un total de 21 genes: 12 HK (7 sobreexpresados y 5 subexpresados) y 9 RR (3 sobreexpresados y 6 subexpresados). Entre los genes sobreexpresados en la cepa *Δgsu1771* están *gsu0470*, que codifica un RR dependiente de Sigma 54 que comparte un 62% de similitud y 42% de identidad con *nla6* de *Myxococcus xanthus*, cuya mutación afecta la agregación celular y la señalización intercelular para el correcto desarrollo de la célula (Caberoy et

al., 2003). También se encuentran sobreexpresados los genes *gsu0471* y *gsu0470* que, mediante análisis por ortología del KEGG se predice que *gsu0471* codifica una HK y *gsu0470* el RR (un activador transcripcional dependiente de sigma 54). Este par es similar al sistema de Dos Componentes ZraS/ZraR, cuya función es activar la expresión de genes en respuesta al estrés de la envoltura celular (Rome et al., 2018).

Por otro lado, entre los genes subexpresados en la cepa Δ *gsu1771* que pertenecen a este grupo, está el par *kdpD/kdpE*, los cuales codifican un sistema de Dos Componentes que activa la vía de captación de K⁺ en respuesta a la limitación de este ión (Heermann y Jung, 2010). También se encuentran subexpresados los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC* que codifican sub unidades del sistema de transporte de potasio regulado por KdpD/KdpE.

En *G. sulfurreducens*, el sistema de Dos Componentes mejor estudiado es PilS/PilR que regula genes relacionados a la producción de biopelícula y la TEE como *pilA*, citocromos tipo-c y de producción de exopolisacáridos (Juarez et al., 2009; Krushkal et al., 2010; Hernández-Eligio et al., 2017; Huerta-Miranda et al., 2019). Por lo que sería interesante estudiar si algunos de los sistemas de Dos Componentes DE en la cepa Δ *gsu1771* tienen un rol en la formación de biopelícula y TEE.

8.4.2. Otros genes con función regulatoria

Entre los genes DE en el RNA-seq que poseen función regulatoria están *fur* (sobreexpresado), *ideR* (sobreexpresado), *csrA* (subexpresado) y *lepA* (sobreexpresado).

El gen *fur* codifica el regulador transcripcional Fur, cuya principal función es controlar el metabolismo de Fe(II) mediante la represión de la adquisición de este ion metálico (Troxell and Hassan, 2013). En *Geobacter sulfurreducens*, Fur activa la expresión de genes de síntesis de pirimidinas, de biotina y del metabolismo energético y, por otro lado, reprime la expresión del transportador de Fe(II) Feo (Embree et al., 2014). Por su parte, IdeR, otro regulador dependiente de Fe(II), forma un clúster junto a *fur* y *feoB*, cuya actividad complementa o incluso compensa la de *fur* en una cepa mutante en este gen (Embree et al., 2014; O'Neil et al., 2008). Se ha propuesto un mecanismo en el

que Fur al unirse a hierro, cambia su estado conformacional para actuar como represor transcripcional y que muchos de los genes modulados por Fur son controlados a través de reguladores secundarios (Jackson et al., 2010). Eso podría explicar el por qué los genes *feoB-1*, *feoB-2*, *gsu3269* (*FeoA*) y *gsu3270* (*FeoA*) que codifican transportadores de hierro, se encuentran sobreexpresados en el transcriptoma de la cepa Δ *gsu1771*.

Por su parte el gen *csrA* que se encuentra subexpresado en la cepa Δ *gsu1771* codifica un regulador postranscripcional que se encarga de reprimir la traducción de una gran cantidad de genes en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano al unirse a secuencias específicas en el ARNm (Romeo, 1998). La actividad de CsrA es controlada por *CsrB*, quien es un ARN no codificante que tiene numerosas secuencias de unión a CsrA, secuestrándola y así evita que se una a sus genes blanco (Romeo, 1998). Entre los genes que CsrA regula están aquellos relacionados al metabolismo del carbono, a la motilidad, producción de exopolisacáridos y formación de biopelícula (Romeo, 1998). En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se ha estudiado el papel de CsrA en *G. sulfurreducens*, dichos estudios consistieron en generar una mutante Δ *csrA*, la cual tiene como fenotipo la formación de una biopelícula más gruesa que la cepa silvestre, fenotipo similar al presente en la cepa Δ *gsu1771*. Finalmente, el gen *lepA*, codifica una GTPasa cuya actividad se induce por los ribosomas (Balakrishnan et al., 2014) y modula la densidad ribosomal sobre ciertos ARNm generalmente de manera positiva, y dependiente de la secuencia Shine–Dalgarno (Balakrishnan et al., 2014). Una mayor transcripción de *lepA* así como una menor de *csrA*, podría favorecer la traducción de *pilA*, *omcS* y *omcZ*, como se observa en los western blot de estas proteínas; así como de otros genes necesarios para la formación de biopelícula y la TEE.

8.5. Unión de la proteína GSU1771 a las regiones de regulación de sus genes blanco

Se seleccionaron los genes *pgcA*, *omcM*, *hybE*, *pulF*, *gsu3356*, *relA*, *acnA* y *gsu1771* para evaluar si la proteína GSU1771 se une a sus regiones reguladoras. Para lo anterior se realizaron ensayos EMSA (Figura 15), en donde la proteína GSU1771 se une a todos los fragmentos probados, excepto a los controles negativos (*gsu303* y *omcB*). En la Figura 15 también se observa que existe mayor

retardo en las regiones de regulación de los genes *pgcA*, *pulF* y *gsu1771*, sugiriendo que estos fragmentos contienen una secuencia con mayor afinidad a GSU1771, seguidos de *gsu3356* y *omcM* y finalmente, *relA*, *hybE* y *acnA* que por lo que se ve en el EMSA, tienen muy poca afinidad con GSU1771 ya que sólo se observa retraso en la movilidad electroforética a la mayor concentración de proteína usada (1 μ M).

8.6. Análisis *in silico* de los posibles sitios de unión de GSU1771

Para poder identificar los posibles sitios de unión de GSU1771, se realizó un análisis *in silico* con el programa MEME con el método “Differential Enrichment mode” que busca motivos que están enriquecidos en un grupo de secuencias, en comparación a una o más secuencias control. Para este análisis, se usaron las secuencias reguladoras de los genes donde se observó una mayor afinidad con GSU1771, los cuales son: *pgcA*, *pulF*, *gsu1771*, *relA*, *hybE* y *acnA* además de *omcS*, *omcZ*, *omcE*, *dcuB* y *frdC* que ya habían demostrado tener alta afinidad con GSU1771 (Hernández-Eligio et al., 2022). Como control negativo se usaron las secuencias *gsu303* y *omcBC*. Los resultados del análisis (Figura 16) muestran tres posibles motivos conservados, ordenados de mayor a menor significancia estadística son: WTYTKYTYTT, GHGGMGGG y AARRKKGK (Figura 16 A), los cuales se encuentran repetidos al menos dos veces en casi todos los casos (Figura 16 C). El motivo AARRKKGK no se encuentra en dos de las secuencias analizadas. Si bien este análisis *in silico* nos da una idea del posible motivo que GSU1771 reconoce en los genes que regula, haría falta un análisis experimental como un “foot-printing” para obtener un resultado conclusivo y obtener la secuencia de unión.

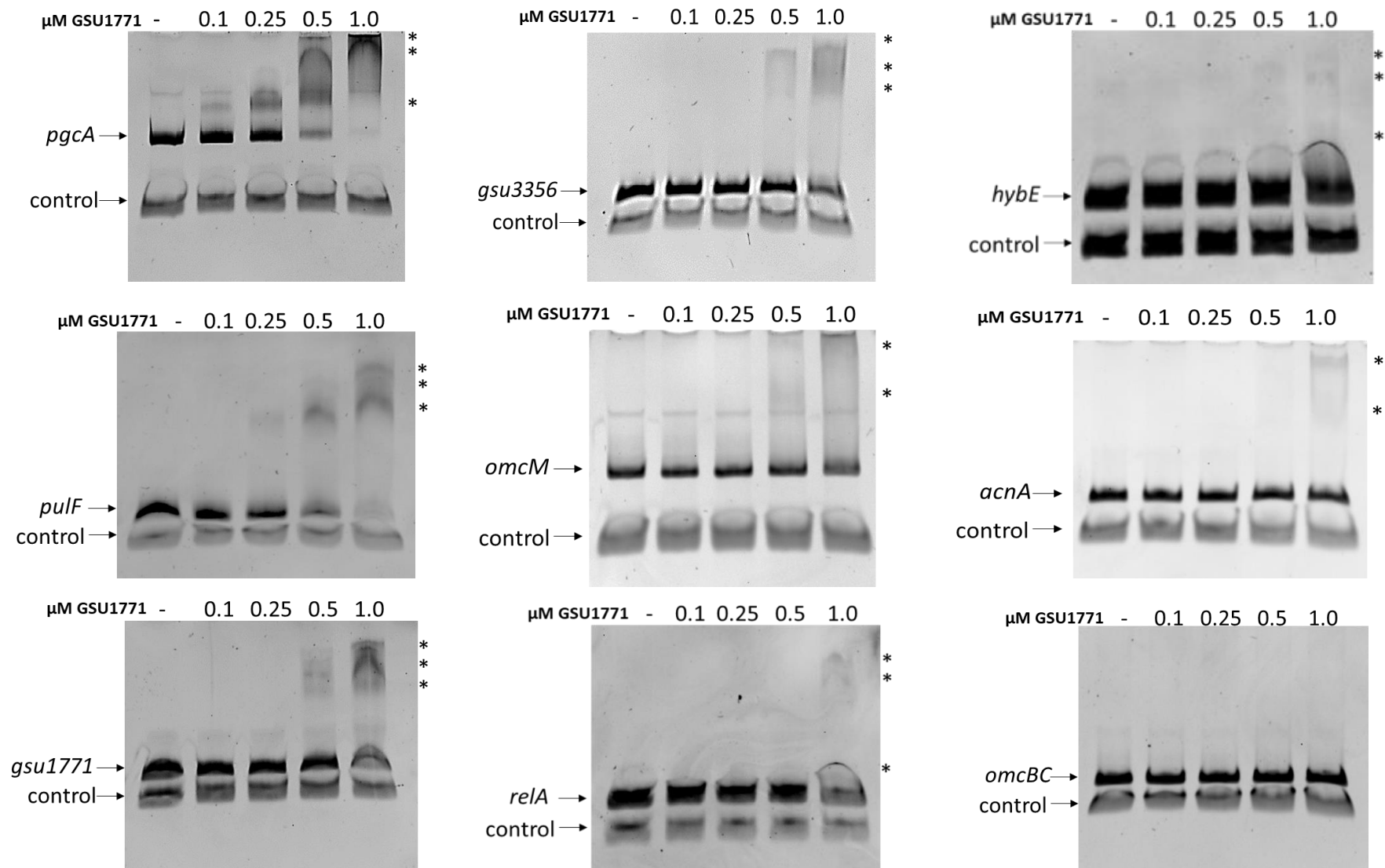


Figura 15. Ensayos EMSA entre las regiones reguladoras de los genes seleccionados y la proteína GSU1771.

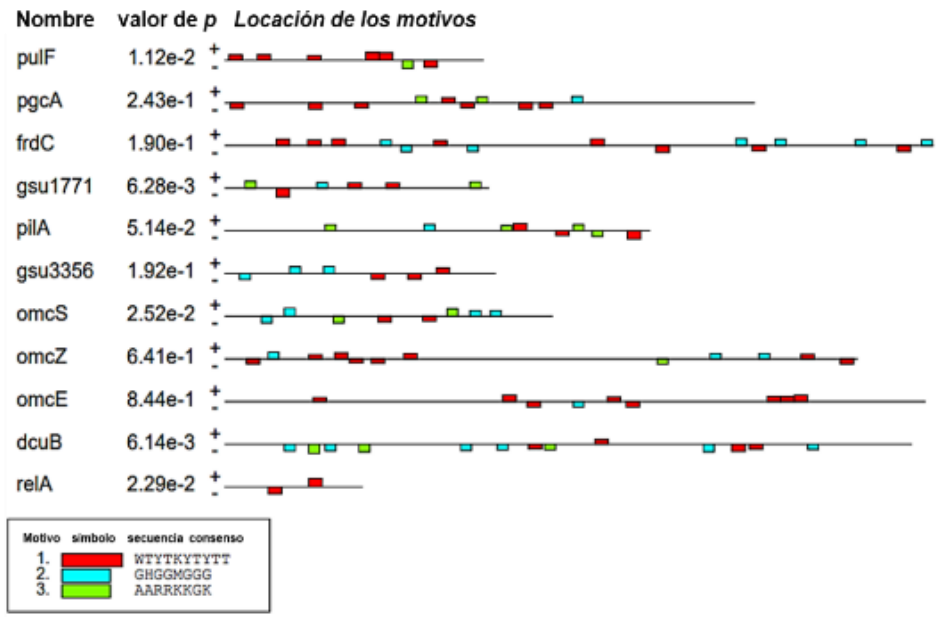
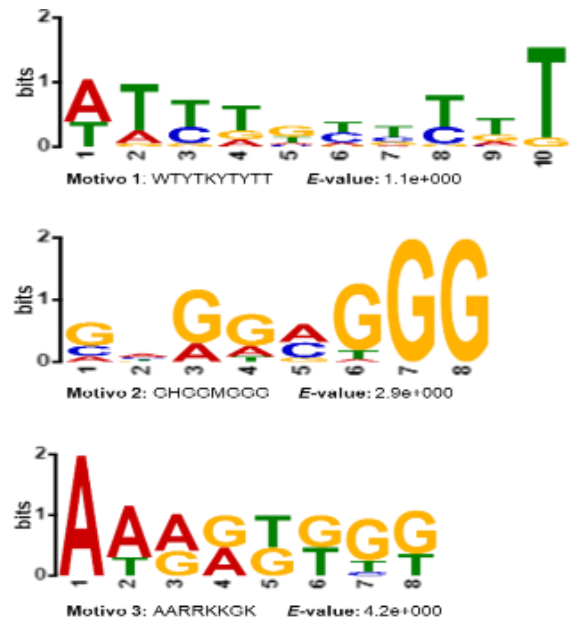


Figura 16. Predicción de secuencia consenso de reconocimiento de GSU1771.
A) Logo de los nucleótidos conservados en los motivos encontrados. **B)** Esquema de la distribución de los motivos en las secuencias analizadas.

8.7. Modelo de regulación global de la cepa Δ gsu1771

De acuerdo al análisis del transcriptoma presentado en este trabajo, se realizó un esquema (Figura 17) en donde se representan de manera global, las principales funciones celulares alteradas en la cepa Δ gsu1771 y que están

relacionadas con la formación de biopelícula y la TEE. Las características de la cepa $\Delta gsu1771$ se podrían deber principalmente a un aumento en la producción de citocromos tipo-c (Figura 13) y de exopolisacáridos (Tabla 5), estos últimos mediante vías que no han sido descritas anteriormente, probablemente de la familia Wzx/Wzy y dependiente de transportador ABC, así como la producción de ácidos sálicos y LPS (sección 8.3.1). La mayor producción de exopolisacáridos favorecería una biopelícula más gruesa, mejor estructurada y además ayudaría a fijar una mayor cantidad de citocromos tipo-c en la matriz extracelular para una TEE más eficiente (Rollefson et al., 2011; Zhuang et al., 2020). Una cantidad importante de sistemas de transporte regulados positivamente como los del tipo ABC, sistemas de secreción y la exosortasa (sección 8.3.2), nos indica que hay un transporte muy activo a través de la membrana en la cepa $\Delta gsu1771$, posiblemente secreción de componentes de la matriz extracelular; estos pueden ser elementos estructurales así como citocromos tipo-c y otras proteínas que ayuden a la TEE como las Omp's (Outer Membrane Proteins), por ejemplo OmpB que es secretada por el SSTII (Mehta et al., 2006). La transcripción de *pilA* aunque disminuye en la cepa mutante (Tabla 4), al parecer no afecta el contenido de la proteína PilA, que se mantiene muy similar que en la cepa silvestre (Figura 15), aunque se desconoce si esto se debe a una acumulación de la proteína o a regulación postranscripcional.

Como se observa en los ensayos EMSA (Figura 15), GSU1771 se une a algunos los genes DE probablemente a numerosos sitios de reconocimiento en las regiones intergénicas río arriba de estos genes (Figura 16) Esto nos podría indicar que GSU1771 regula directamente estos genes. Sin embargo, otros genes pueden estar controlados indirectamente mediante reguladores como Fur, IdeR y CsrA además de cambios en la transducción de señales mediadas por sistemas de Dos Componentes y diguanilato ciclasas (sección 8.4).

Finalmente, se detectó la disminución en la expresión de genes que codifican enzimas del TCA, síntesis de purinas y metabolismo del ADN (Figura 17). Esto podría indicar que la célula disminuye ciertos procesos metabólicos para favorecer la producción de los elementos necesarios para la producción de la biopelícula y la TEE como ya se ha propuesto anteriormente en biopelículas de *Geobacter* (Kavanagh et al., 2016).

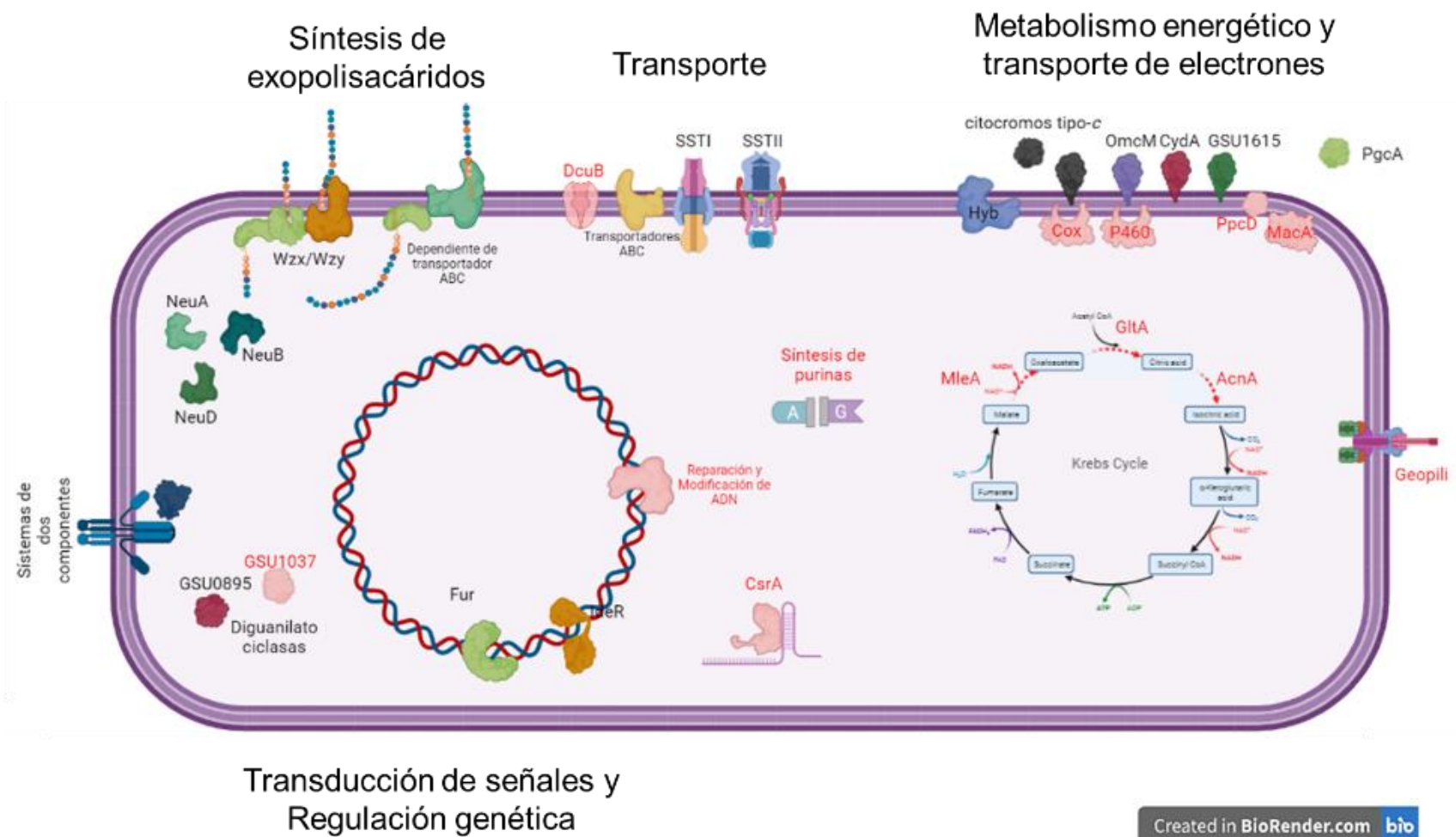


Figura 17. Modelo de los principales procesos celulares regulados en la cepa Δ gsu1771. Los nombres en negro indican sobreexpresión y en rojo subexpresión. Creado en BioRender.com

9. Conclusiones

- La delección del gen *gsu1771* afecta la expresión de al menos 467 genes relacionados con diferentes funciones celulares que van desde el metabolismo energético, producción de exopolisacáridos, transporte y regulación.
- GSU1771 se había descrito como un regulador negativo (Tremblay et al., 2011; Hernández-Eligio et al., 2022); sin embargo, también podría actuar como un activador transcripcional.
- GSU1771 interactúa directamente con las regiones reguladoras de sus genes blanco posiblemente reconociendo los motivos WTYTKYTYTT o GHGGMGGG.
- La expresión de una gran cantidad de reguladores y sistemas de transducción de señales se vio alterada en la biopelícula formada por cepa Δ *gsu1771*. Por lo que la sobreexpresión o subexpresión de muchos genes podría ser el resultado tanto de un efecto directo como uno indirecto de la delección de *gsu1771*.
- La biopelícula altamente electroconductiva de la cepa Δ *gsu1771* podría deberse al incremento en la producción de exopolisacáridos mediante novedosas vías que no se han descrito antes en el género *Geobacter* y a la sobreproducción de citocromos tipo-*c*, además de un transporte activo que podría ayudar a fijar elementos importantes en la matriz extracelular.

10. Perspectivas

- Caracterizar las vías de síntesis de exopolisacáridos sobreexpresadas en la cepa $\Delta gsu1771$.
- Realizar purificación fraccionada de citocromos tipo-c y tinción hemo de las biopelículas de las cepas silvestre y $\Delta gsu1771$ para determinar el contenido de citocromos.
- Evaluar la producción del geopili en otras condiciones de formación de biopelícula.
- Identificar la que GSU1771 reconoce sus genes blanco mediante footprinting.
- Evaluar el perfil transcriptómico de la cepa $\Delta gsu1771$ en biopelículas de celdas microbianas de combustible.
- Mutar algunos genes DE en el transcriptoma que puedan afectar la formación de biopelícula y la TEE, y caracterizar su fenotipo.

11. Bibliografía

Aklujkar, M., Coppi, M.V., Leang, C., Kim, B.C., Chavan, M.A., Perpetua, L.A., Giloteaux, L., Liu, A., and Holmes, D.E. (2013). Proteins involved in electron transfer to Fe(III) and Mn(IV) oxides by *Geobacter sulfurreducens* and *Geobacter uraniireducens*. *Microbiology* 159, 515-535.

Andrade, A., Hernandez-Eligio, A., Tirado, A.L., Vega-Alvarado, L., Olvera, M., Morett, E., and Juarez, K. (2021). Specialization of the Reiterated Copies of the Heterodimeric Integration Host Factor Genes in *Geobacter sulfurreducens*. *Front Microbiol* 12, 626443.

Balakrishnan, R., Oman, K., Shoji, S., Bundschuh, R., and Fredrick, K. (2014). The conserved GTPase LepA contributes mainly to translation initiation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 42, 13370-13383.

Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol* 69, 1548-1555.

Butler, J.E., Glaven, R.H., Esteve-Nunez, A., Nunez, C., Shelobolina, E.S., Bond, D.R., and Lovley, D.R. (2006). Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction ysuccinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* yengineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol* 188, 450-455.

Butler, J.E., Young, N.D., and Lovley, D.R. (2010). Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics* 11, 40.

Cipolla, L., Polissi, A., Airoidi, C., Galliani, P., Sperandeo, P., and Nicotra, F. (2009). The Kdo biosynthetic pathway toward OM biogenesis as target in antibacterial drug design and development. *Curr Drug Discov Technol* 6, 19-33.

Clark, M.M., Paxhia, M.D., Young, J.M., Manzella, M.P., and Reguera, G. (2021). Adaptive Synthesis of a Rough Lipopolysaccharide in *Geobacter sulfurreducens* for Metal Reduction and Detoxification. *Appl Environ Microbiol* 87, e0096421.

Coates, J.D., & Lovley, D. R. (2015). *Geobacter*. In W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, et al. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*.

Coppi, M.V. (2005). The hydrogenases of *Geobacter sulfurreducens*: a comparative genomic perspective. *Microbiology (Reading)* 151, 1239-1254.

Coppi, M.V., Leang, C., Sandler, S.J., and Lovley, D.R. (2001). Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 67, 3180-3187.

Coppi, M.V., O'Neil, R.A., and Lovley, D.R. (2004). Identification of an uptake hydrogenase required for hydrogen-dependent reduction of Fe(III) yother electron acceptors by *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 186, 3022-3028.

- Davidson, A.L., and Chen, J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 73, 241-268.
- DiDonato, L.N., Sullivan, S.A., Methe, B.A., Nevin, K.P., England, R., and Lovley, D.R. (2006). Role of RelGsu in stress response γ Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 188, 8469-8478.
- Dulay, H., Tabares, M., Kashefi, K., and Reguera, G. (2020). Cobalt Resistance via Detoxification and Mineralization in the Iron-Reducing Bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *Front Microbiol* 11, 600463.
- Embree, M., Qiu, Y., Shieu, W., Nagarajan, H., O'Neil, R., Lovley, D., and Zengler, K. (2014). The iron stimulon yfur regulon of *Geobacter sulfurreducens* and their role in energy metabolism. *Appl Environ Microbiol* 80, 2918-2927.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563-575.
- Galperin, M.Y. (2005). A census of membrane-bound intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts yintroverts. *BMC Microbiol* 5, 35.
- Haft, D.H., Paulsen, I.T., Ward, N., and Selengut, J.D. (2006). Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol* 4, 29.
- Hernandez-Eligio, A., Andrade, A., Soto, L., Morett, E., and Juarez, K. (2017). The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates pilA gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 25693-25701.
- Hernandez-Eligio, A., Pat-Espadas, A.M., Vega-Alvarado, L., Huerta-Amparan, M., Cervantes, F.J., and Juarez, K. (2020). Global transcriptional analysis of *Geobacter sulfurreducens* under palladium reducing conditions reveals new key cytochromes involved. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 4059-4069.
- Hernández-Eligio, J. A., Huerta-Miranda, G.A., Martínez-Bahena, S., Castrejón-López D., Miranda-Hernández, M. Juárez, K. (2022). GSU1771 regulates extracellular electron transfer and electroactive biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*: Genetic and electrochemical characterization. *Bioelectrochem* 145, 1567-5394.
- Holmes, D.E., Dang, Y., Walker, D.J.F., and Lovley, D.R. (2016). The electrically conductive pili of *Geobacter* species are a recently evolved feature for extracellular electron transfer. *Microb Genom* 2, e000072.
- Hospenthal, M.K., Costa, T.R.D., and Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15, 365-379.

Huerta-Miranda, G.A., Arroyo-Escoto, A.I., Burgos, X., Juarez, K., and Miranda-Hernandez, M. (2019). Influence of the major pilA transcriptional regulator in electrochemical responses of *Geobacter sulfurreducens* PilR-deficient mutant biofilm formed on FTO electrodes. *Bioelectrochemistry* 127, 145-153.

Huerta-Amparán J. M. (2021), Estudio del efecto del segundo mensajero c-di-GMP en los procesos de transferencia extracelular de electrones y formación de biopelícula en *Geobacter sulfurreducens*, Tesis para obtener el título de Maestro en ciencias, UNAM.

Juarez, K., Kim, B.C., Nevin, K., Olvera, L., Reguera, G., Lovley, D.R., and Methe, B.A. (2009). PilR, a transcriptional regulator for pilin y other genes required for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16, 146-158.

Jurcisek, J., Greiner, L., Watanabe, H., Zaleski, A., Apicella, M.A., and Bakaletz, L.O. (2005). Role of sialic acid y complex carbohydrate biosynthesis in biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla middle ear. *Infect Immun* 73, 3210-3218.

Juty, N.S., Moshiri, F., Merrick, M., Anthony, C., and Hill, S. (1997). The *Klebsiella pneumoniae* cytochrome bd' terminal oxidase complex y its role in microaerobic nitrogen fixation. *Microbiology (Reading)* 143 (Pt 8), 2673-2683.

Kai, A., Tokuishi, T., Fujikawa, T., Kawano, Y., Ueki, T., Nagamine, M., Sakakibara, Y., Suiko, M., and Inoue, K. (2021). Proteolytic Maturation of the Outer Membrane c-Type Cytochrome OmcZ by a Subtilisin-Like Serine Protease Is Essential for Optimal Current Production by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 87, e0261720.

Kavanagh, P., Botting, C.H., Jana, P.S., Leech, D., and Abram, F. (2016). Comparative proteomics implicates a role for multiple secretion systems in electrode-respiring *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *J Proteome Res* 15, 4135-4145.

Krushkal, J., Juarez, K., Barbe, J.F., Qu, Y., Andrade, A., Puljic, M., Adkins, R.M., Lovley, D.R., y Ueki, T. (2010). Genome-wide survey for PilR recognition sites of the metal-reducing prokaryote *Geobacter sulfurreducens*. *Gene* 469, 31-44.

Leang, C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2003). OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 185, 2096-2103.

Leang, C., Krushkal, J., Ueki, T., Puljic, M., Sun, J., Juarez, K., Nunez, C., Reguera, G., DiDonato, R., and Postier, B. (2009). Genome-wide analysis of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Genomics* 10, 331.

Lemos, J.A., Brown, T.A., Jr., and Burne, R.A. (2004). Effects of RelA on key virulence properties of planktonic y biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 72, 1431-1440.

Liu, X., Tremblay, P.L., Malvankar, N.S., Nevin, K.P., Lovley, D.R., and Vargas, M. (2014). A *Geobacter sulfurreducens* strain expressing *pseudomonas*

aeruginosa type IV pili localizes OmcS on pili but is deficient in Fe(III) oxide reduction and current production. *Appl Environ Microbiol* 80, 1219-1224.

Limoli, D.H., Jones, C.J., and Wozniak, D.J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation yFunction. *Microbiol Spectr* 3.

Lin, W.C., Coppi, M.V., and Lovley, D.R. (2004). *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl Environ Microbiol* 70, 2525-2528.

Liu, X., Gao, H., Ward, J.E., Liu, X., Yin, B., Fu, T., Chen, J., Lovley, D.R., and Yao, J. (2020). Power generation from ambient humidity using protein nanowires. *Nature* 578, 550-554.

Lloyd, J.R. (2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* 27, 411-425.

Lovley, D.R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 4, 497-508.

Lovley, D.R., Ueki, T., Zhang, T., Malvankar, N.S., Shrestha, P.M., Flanagan, K.A., Aklujkar, M., Butler, J.E., Giloteaux, L., and Rotaru, A.E. (2011). *Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, ypractical applications*. *Adv Microb Physiol* 59, 1-100.

Lovley, D.R., and Walker, D.J.F. (2019). *Geobacter* Protein Nanowires. *Front Microbiol* 10, 2078.

Malvankar, N.S., Vargas, M., Nevin, K., Tremblay, P.L., Evans-Lutterodt, K., Nykypanchuk, D., Martz, E., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2015). Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires. *mBio* 6, e00084.

Methe, B.A., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Paulsen, I.T., Nelson, W., Heidelberg, J.F., Wu, D., Wu, M., Ward, N., and Beanan, M.J. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* 302, 1967-1969.

Mehta, T., Childers, S.E., Glaven, R., Lovley, D.R., and Mester, T. (2006). A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology (Reading)* 152, 2257-2264.

Mehta, T., Coppi, M.V., Childers, S.E., and Lovley, D.R. (2005). Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) yMn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 71, 8634-8641.

Methe, B.A., Webster, J., Nevin, K., Butler, J., and Lovley, D.R. (2005). DNA microarray analysis of nitrogen fixation yFe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 71, 2530-2538.

Mollaei, M., Timmers, P.H.A., Suarez-Diez, M., Boeren, S., van Gelder, A.H., Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2021). Comparative proteomics of *Geobacter sulfurreducens* PCA(T) in response to acetate, formate and/or hydrogen as electron donor. *Environ Microbiol* 23, 299-315.

- Morgado, L., Bruix, M., Pessanha, M., Londer, Y.Y., and Salgueiro, C.A. (2010). Thermodynamic characterization of a triheme cytochrome family from *Geobacter sulfurreducens* reveals mechanistic yfunctional diversity. *Biophys J* 99, 293-301.
- Nevin, K.P., Kim, B.C., Glaven, R.H., Johnson, J.P., Woodard, T.L., Methe, B.A., Didonato, R.J., Covalla, S.F., Franks, A.E., and Liu, A. (2009). Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One* 4, e5628.
- O'Neil, R.A., Holmes, D.E., Coppi, M.V., Adams, L.A., Larrahondo, M.J., Ward, J.E., Nevin, K.P., Woodard, T.L., Vrionis, H.A., and N'Guessan, A.L. (2008). Gene transcript analysis of assimilatory iron limitation in Geobacteraceae during groundwater bioremediation. *Environ Microbiol* 10, 1218-1230.
- Ostapska, H., Howell, P.L., and Sheppard, D.C. (2018). Deacetylated microbial biofilm exopolysaccharides: It pays to be positive. *PLoS Pathog* 14, e1007411.
- Rathinam, N.K., and Sani, R.K. (2019). Introduction to biofilm engineering. In ACS symposium series 1323 (Washington, DC, American Chemical Society,), p. 1 online resource.
- Reardon, P.N., yMueller, K.T. (2013). Structure of the type IVa major pilin from the electrically conductive bacterial nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *J Biol Chem* 288, 29260-29266.
- Reguera, G. (2018a). Microbial nanowires and electroactive biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 94.
- Reguera, G. (2018b). Harnessing the power of microbial nanowires. *Microb Biotechnol* 11, 979-994.
- Reguera, G., and Kashafi, K. (2019). The electrifying physiology of *Geobacter* bacteria, 30 years on. *Adv Microb Physiol* 74, 1-96.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098-1101.
- Reguera, G., Nevin, K.P., Nicoll, J.S., Covalla, S.F., Woodard, T.L., and Lovley, D.R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl Environ Microbiol* 72, 7345-7348.
- Reguera, G., Pollina, R.B., Nicoll, J.S., and Lovley, D.R. (2007). Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J Bacteriol* 189, 2125-2127.
- Rollefson, J.B., Stephen, C.S., Tien, M., and Bond, D.R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring ybiofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 193, 1023-1033.
- Rome, K., Borde, C., Taher, R., Cayron, J., Lesterlin, C., Gueguen, E., De Rosny, E., and Rodrigue, A. (2018). The Two-Component System ZraPSR Is a Novel ESR that Contributes to Intrinsic Antibiotic Tolerance in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 430, 4971-4985.

Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 29, 1321-1330.

Romling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1-52.

Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol* 6, 496.

Smith, J.A., Tremblay, P.L., Shrestha, P.M., Snoeyenbos-West, O.L., Franks, A.E., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014). Going wireless: Fe(III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Appl Environ Microbiol* 80, 4331-4340.

Smith, J.A., Tremblay, P.L., Shrestha, P.M., Snoeyenbos-West, O.L., Franks, A.E., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (2014). Going wireless: Fe(III) oxide reduction without pili by *Geobacter sulfurreducens* strain JS-1. *Appl Environ Microbiol* 80, 4331-4340.

Starosta, A.L., Lassak, J., Jung, K., and Wilson, D.N. (2014). The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev* 38, 1172-1201.

Sperandeo, P., Martorana, A.M., and Polissi, A. (2017). The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 292, 17981-17990.

Starosta, A.L., Lassak, J., Jung, K., and Wilson, D.N. (2014). The bacterial translation stress response. *FEMS Microbiol Rev* 38, 1172-1201.

Steidl, R.J., Lampa-Pastirk, S., and Reguera, G. (2016). Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nat Commun* 7, 12217.

Stöckl, M., Teubner, N.C., Holtmann, D., Mangold, K.M., and Sand, W. (2019). Extracellular Polymeric Substances from *Geobacter sulfurreducens* Biofilms in Microbial Fuel Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 11, 8961-8968.

Tremblay, P.L., Summers, Z.M., Glaven, R.H., Nevin, K.P., Zengler, K., Barrett, C.L., Qiu, Y., Palsson, B.O., and Lovley, D.R. (2011). A c-type cytochrome *ya* transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* revealed by adaptive evolution. *Environ Microbiol* 13, 13-23.

Tremblay, P.L., and Lovley, D.R. (2012). Role of the NiFe hydrogenase Hya in oxidative stress defense in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 194, 2248-2253.

Troxell, B., and Hassan, H.M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 59.

- Ueki, T. (2021). Cytochromes in Extracellular Electron Transfer in *Geobacter*. *Appl Environ Microbiol* 87.
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J.P., Yi, S.M., Yalcin, S.E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N.L., and Hochbaum, A.I. (2019). Structure of Microbial Nanowires Reveals Stacked Hemes that Transport Electrons over Micrometers. *Cell* 177, 361-369 e310.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol* 4, 752-764.
- Wietzorrek, A., and Bibb, M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 25, 1181-1184.
- Yoshida, T., Ayabe, Y., Yasunaga, M., Usami, Y., Habe, H., Nojiri, H., and Omori, T. (2003). Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylophilic *Methylobacillus* sp strain 12S. *Microbiology (Reading)* 149, 431-444.
- Zacharoff, L.A., Morrone, D.J., and Bond, D.R. (2017). *Geobacter sulfurreducens* Extracellular Multiheme Cytochrome PgcA Facilitates Respiration to Fe(III) Oxides But Not Electrodes. *Front Microbiol* 8, 2481.
- Zhuang, Z., Yang, G., Mai, Q., Guo, J., Liu, X., and Zhuang, L. (2020). Physiological potential of extracellular polysaccharide in promoting *Geobacter biofilm* formation and extracellular electron transfer. *Sci Total Environ* 741, 140365.
- Zhang, W., Li, F., and Nie, L. (2010). Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology (Reading)* 156, 287-301.

12. Material suplementario

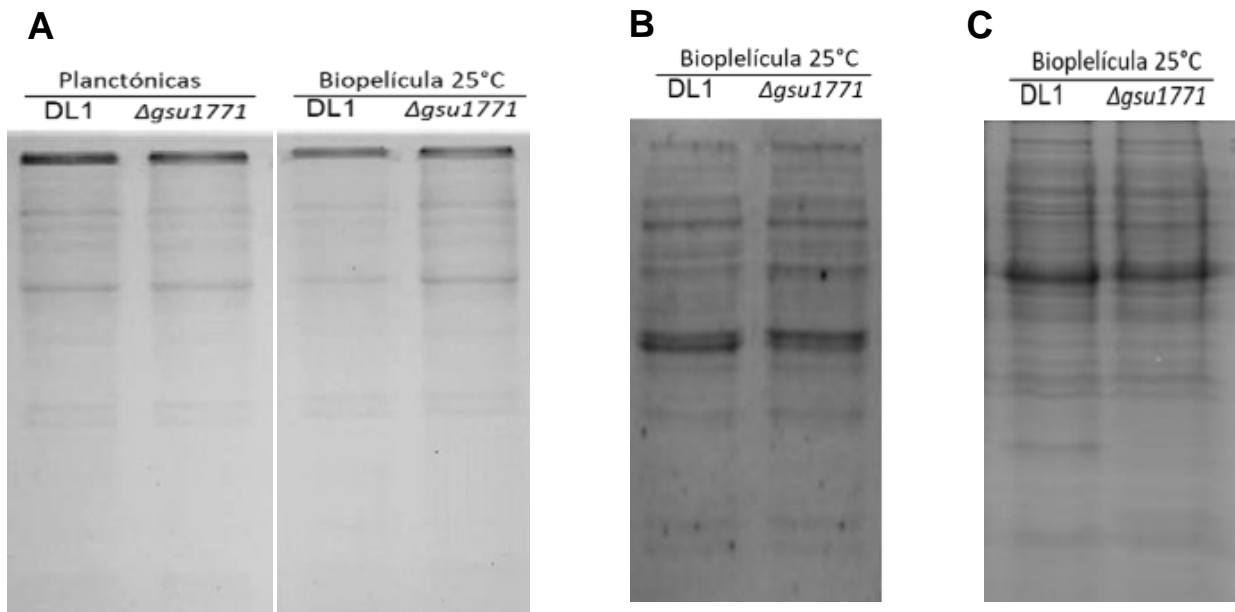


Figura S1. SDS-PAGE de control de carga de: A) tinción hemo y western Blot de B) OmcS y C) OmcZ.

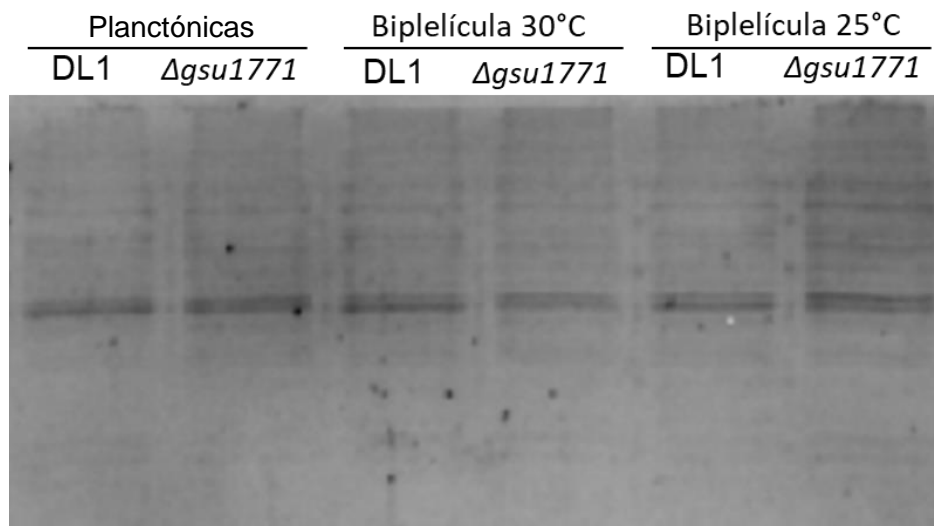
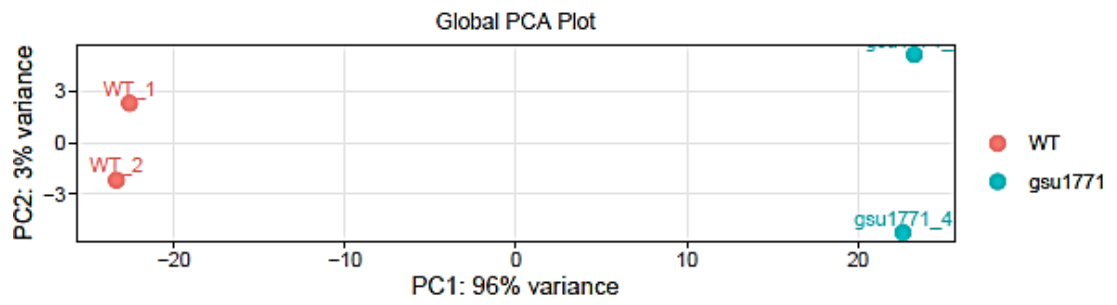
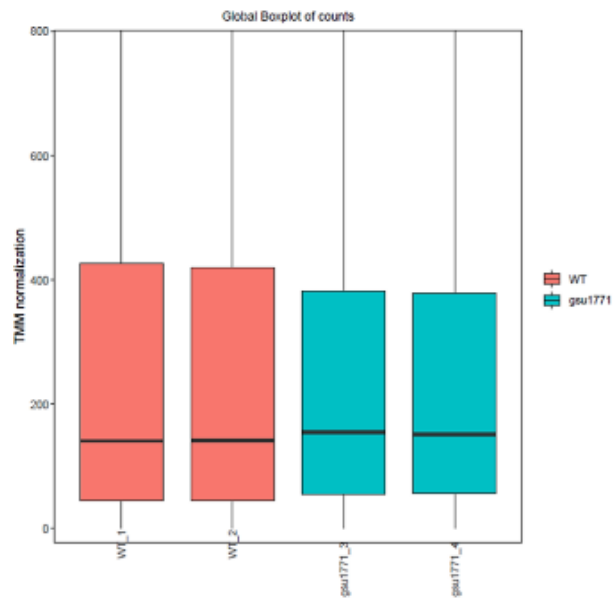
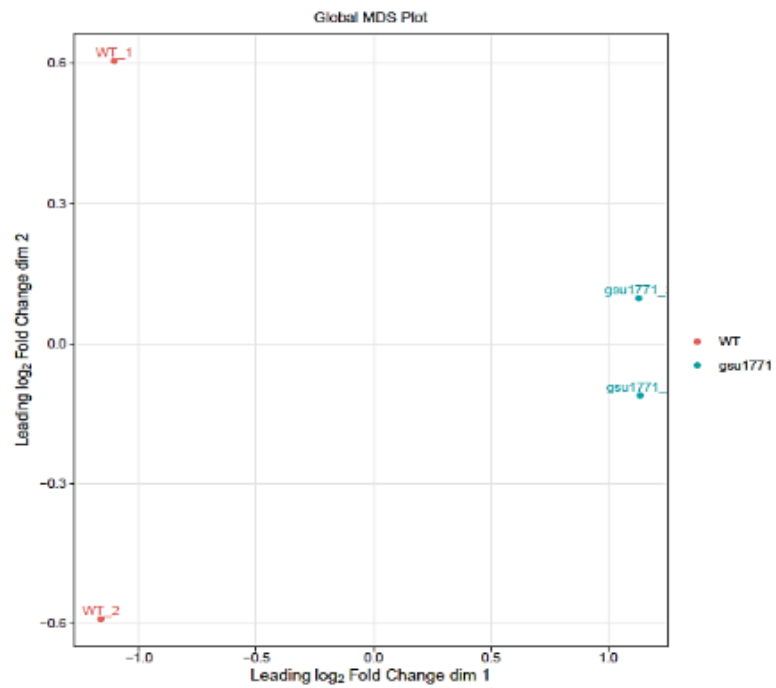


Figura S2. SDS-PAGE de control de carga del western blot de PilA.

A**B****C**

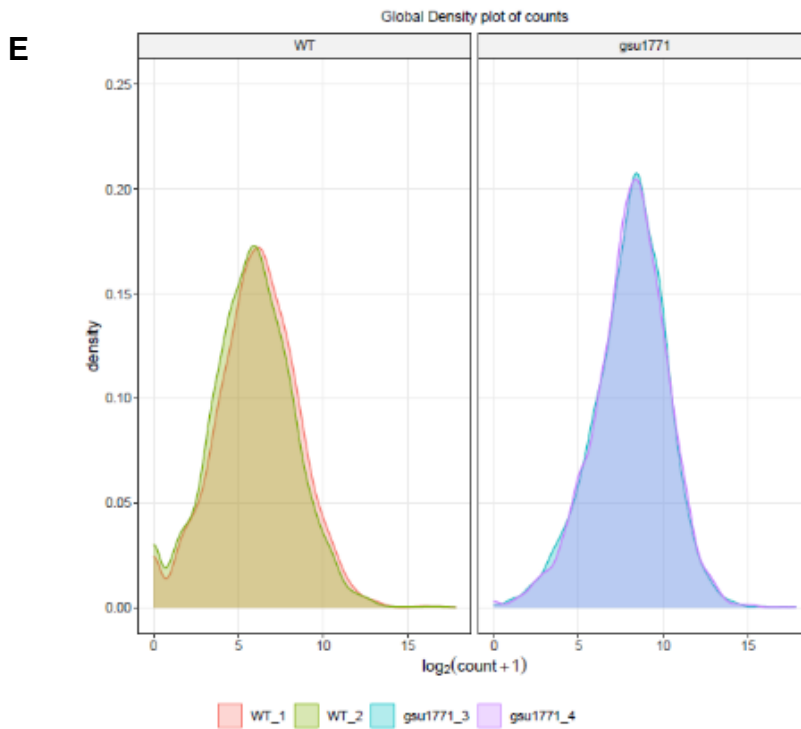
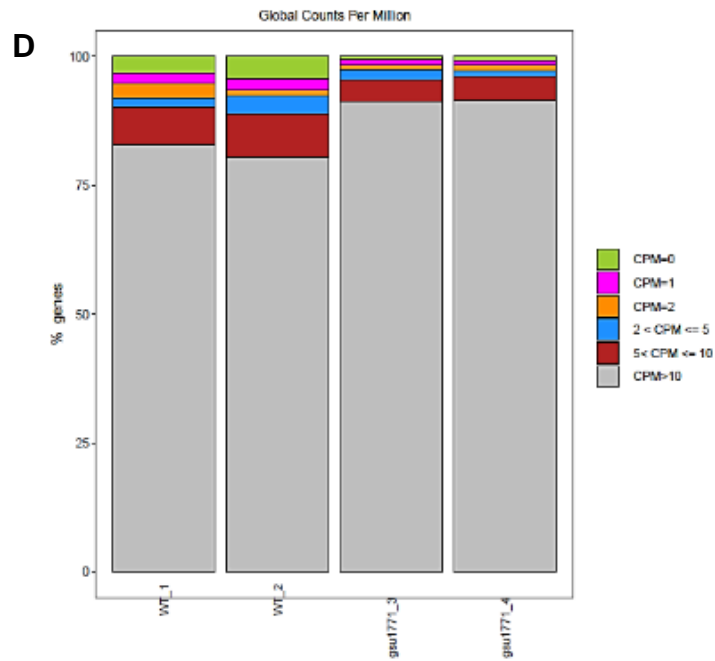
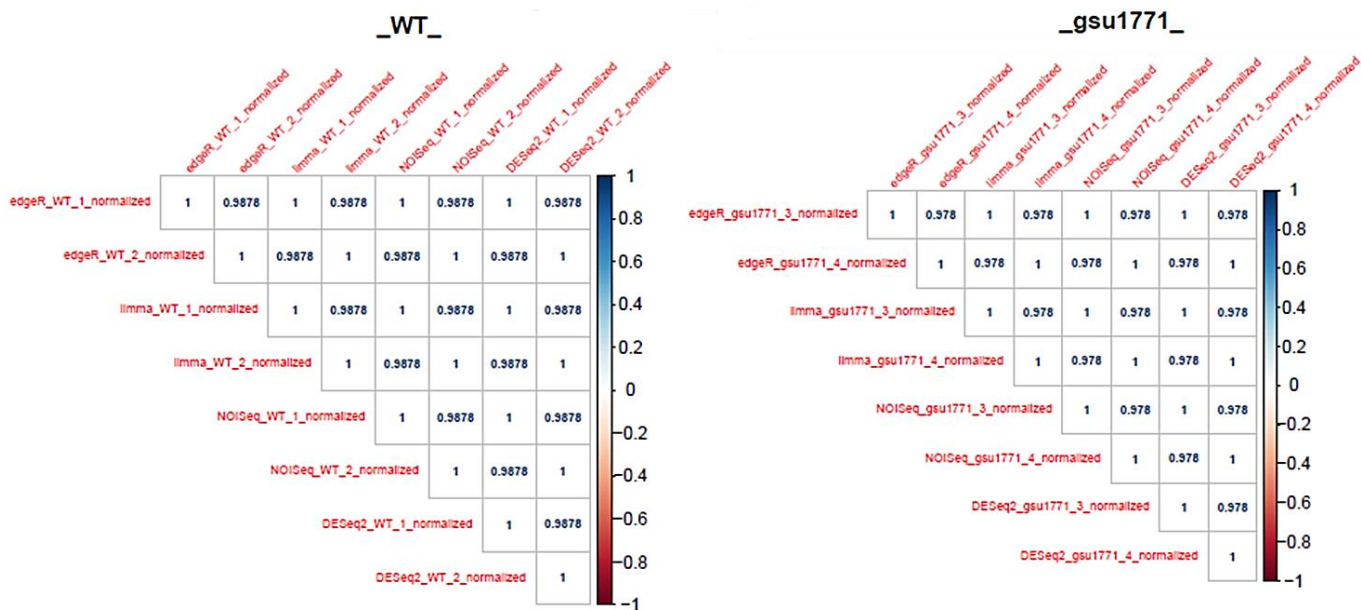


Figura S3. Resultados del análisis global de datos del RNA-seq. A) gráfica de PCA global, B) gráfica MDS global, C) diagrama de caja global de recuentos, D) conteos globales por millón y E) diagramas de densidad global de los recuentos.

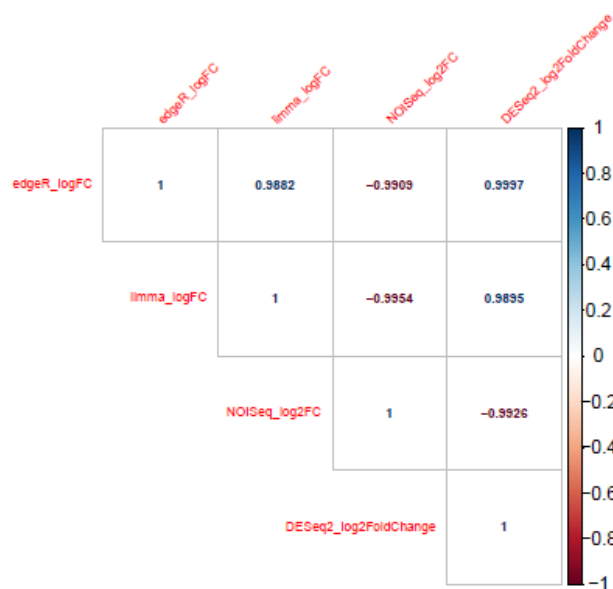
A

abundances correlation WTvsgsu1771

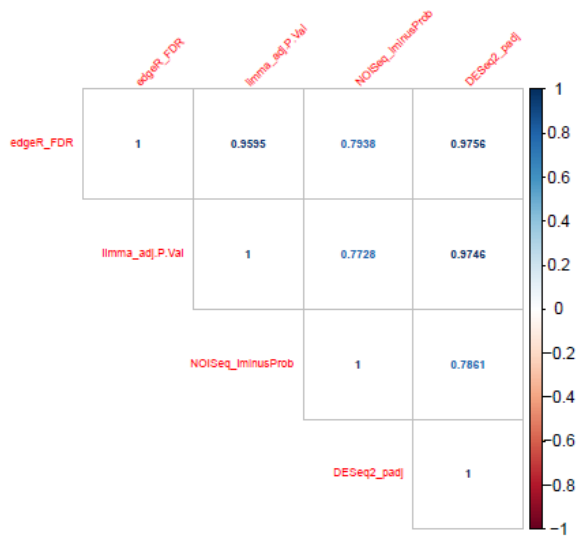


B

logFC correlation WTvsgsu1771



pval correlation WTvsgsu1771



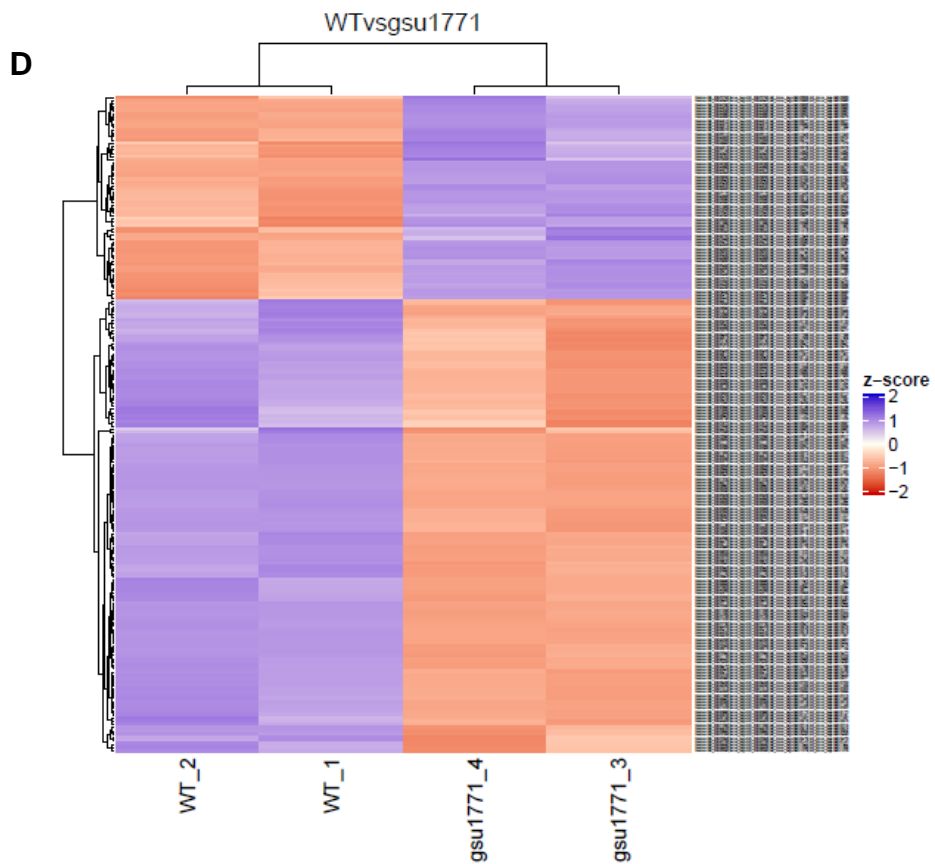
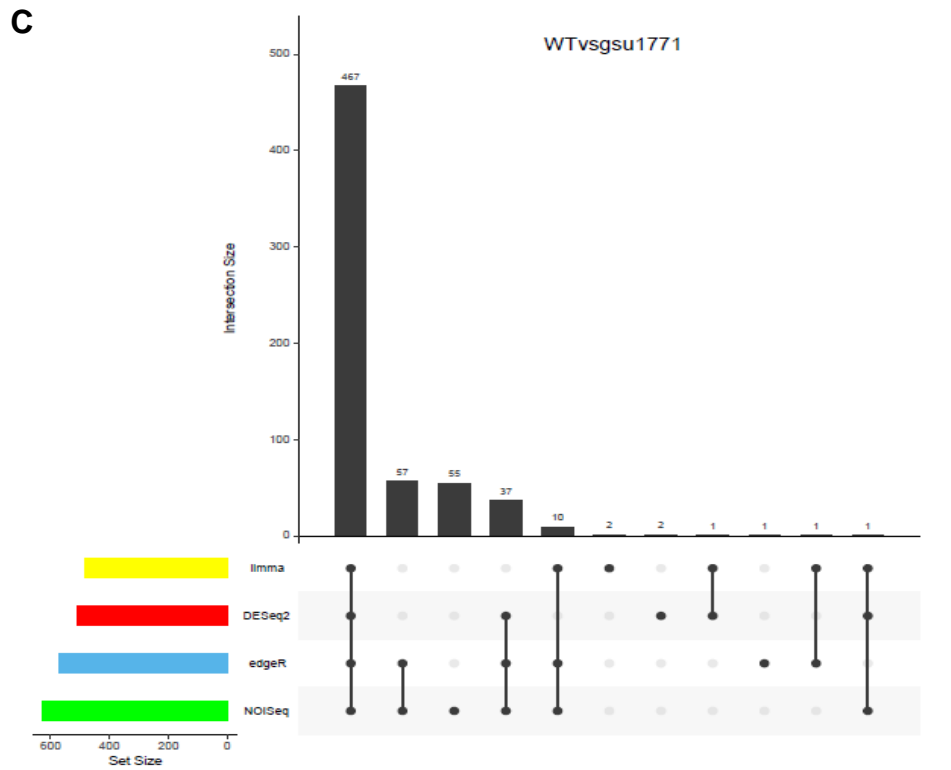


Figura S4. Integración de resultados del transcriptoma WT vs Δ gsu1771 en IDEAMEX. A) Correlación de abundancias B) correlación LogFC y p -value C) gráfica alterada D) diagrama de calor.