

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Construcción y caracterización de la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en *Geobacter sulfurreducens* y su relación con la transferencia extracelular de electrones



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

1942
Presenta:

Jesús Manuel Huerta Amparán

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, bajo la dirección del Dr. José Alberto Hernández Eligio. Este proyecto fue financiado por CONACyT CB (2015-1)-255476 y PAPIIT IN210017.

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de **Jesús Manuel Huerta Amparán** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado **Construcción y caracterización de la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en *Geobacter sulfurreducens* y su relación con la transferencia extracelular de electrones**, y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dr. José Alberto Hernández Eligio

Presidente

Mtra. Sandra González Martínez

Secretario

Q. Sandra Miranda Mauricio

Vocal

Dra. Luz Angélica Ávila Villa

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mis abuelos, mis tíos y primos, mis padres y mi hermano, simplemente, las personas más importantes en mi vida. Son mis pilares y mi fortaleza, sin ustedes mi mundo se derrumba por completo. Lo son todo y me lo han dado todo. He llegado hasta aquí y soy lo que soy gracias a ustedes. Los amo infinitamente.

Al Dr. José Alberto Hernández Eligio, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su línea de investigación; por haberme acercado por vez primera al mundo de la ciencia; por permitirme crecer como estudiante y como persona; por sus enseñanzas y consejos dentro y fuera del laboratorio; por ser una gran y buena persona, mi tutor, maestro y amigo; pero, principalmente, por su infinito e incondicional apoyo y confianza en todo momento. Muchas gracias por todo Beto, gracias por ser el mejor tutor.

Al Q. Manuel Armando Lizárraga Rubio, por sus enseñanzas, consejos y motivación de ser mejores personas y estudiantes; por su gran amor a la química y a la ciencia en general, el cual fue transmitido a mí y a muchos de mis compañeros; por cambiar mi forma de pensar...Por hacerme razonar y no memorizar, por hacerme cuestionar el porqué de las cosas; por sus excelentes clases y su excelente trabajo enseñando; en resumen, por ser el mejor profesor que haya tenido. De verdad, muchas gracias.

A la Q. Sandra Miranda Mauricio, por su gran cariño, simpatía, carisma, gozo, y esa sonrisa y felicidad que se transmiten; por sus cuidados y su apoyo incondicional en cualquier situación... Por apoyarme y motivarme tanto; por sus excelentes clases, por el amor a su trabajo y a nuestra profesión que me hacen disfrutar mi carrera; por ser una excelente maestra, amiga y mejor persona. Disfruté muchísimo sus clases y sus enseñanzas. Sinceramente, agradecido eternamente de haber sido su alumno. Mil gracias.

Al Dr. David Octavio Corona Martínez, por su apoyo a lo largo de toda mi carrera; por sus enseñanzas y los conocimientos que adquirí gracias a él; por la madurez (que aún no tengo) que trató de inculcar en mí; por hacerme amar a la química y a la ciencia; por sus regaños y consejos; por tratar de hacerme razonar sobre la vida y las decisiones que tomo... Y sobre las cosas que digo, pienso y hago. Por todo esto y más, te agradezco David.

A la Mtra. Sandra González Martínez, por su apoyo, tiempo y dedicación como profesora y como mi asesora interna de tesis. Muchas gracias.

A la Dra. Katy Juárez López, por haberme permitido trabajar en su línea de investigación; por sus enseñanzas, regaños y apoyo en el laboratorio, así como los tiempos de convivencia fuera de este. Sinceramente, muchas gracias.

A mis sinodales, el Dr. José Alberto Hernández, la Q. Sandra Miranda, la Mtra. Sandra González y la Dra. Luz Angélica Ávila Villa, por las revisiones y comentarios hechos a este trabajo. Muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, la Dra. Paloma Lara y la Q. Xadeni Burgos, por su gran sustento y apoyo, pero sobre todo por siempre estar disponibles para resolver mis dudas y estar dispuestas a ayudarme. **A Italia Moreno, Yaraseth Gutiérrez, Fanny Flores, Emmanuel Alvizo, Lidia Piñones, Dulce Policao, Getzabet González y Yoatzin Domínguez,** por su amistad y gran trabajo en el laboratorio. Gracias.

A los “Saab”. A la Dra. Gloria Saab Rincón, por ayudarme con mis dudas y explicarme cuando lo necesité. **Al Dr. Humberto Flores Soto y la Ing. Leticia Olvera,** por su apoyo técnico y ayuda en el laboratorio. **A Rodrigo Arreola, Emma Arévalo, Valeria Guzmán, Peniel Bustamante, Edson Cárcamo, Jair López, Alfonso Miranda, Wendy Xolalpa, Carolina Salinas y Brenda Uribe,** por su gran amistad. Gracias.

A Cori, Don Javier y Don Toño, por su excelente trabajo preparando el material del laboratorio.

Al Dr. Enrique Morett, por formar un gran grupo de trabajo del cual formé parte. Gracias.

A la Biol. Soledad Moreno, por su apoyo con enzimas y cassettes de resistencia a antibióticos. Gracias.

A todos los compañeros y amigos que logré hacer en IBt, en UAEM y en Cuernavaca en general, los cuales no voy a citar, pero me siento agradecido de haberlos conocido a todos y cada uno de ustedes. Aprendí y me divertí mucho con todos. De verdad, muchísimas gracias por hacer de Cuernavaca más que una segunda casa.

A mis compañeros y amigos de carrera, Zulema Chalas, Horacio Coronado, Sergio Valle, Cinthia Burgos, Marco Mercado, Dalia Cruz, Aldo Torres, Rubén Martínez y Agustín Martínez. Me alegra haberlos conocido y compartido tantos momentos juntos. Aprendí mucho de ustedes. Fueron una parte esencial de mi formación universitaria y de mi vida. Muchas gracias.

A mis compañeros y amigos de toda la vida, los cuales no voy a citar a todos, pero me gustaría resaltar a **Luis Antonio Márquez Romero (el “Cochito”), Ramón Antonio Palazuelos Ibarra y Moisés Sarabia Molina,** que si bien no nos vemos todos los días, sé que siempre están ahí para mí. Han sido parte de mi vida desde hace muchos años. Los estimo muchísimo. Muchas gracias.

Y a una gran lista de personas más: la Dra. María Elena Zayas, el Dr. Marco Antonio López Mata, la Mtra. Susana Margarita Quintero Pérez, la Mtra. Viridiana Gómez Barrón, el Dr. Julio César Campos García, el Dr. Mario Hiram Uriarte Montoya, el Dr. Oscar Rubén Gómez Aldama, el Dr. Joel Arias Martínez, el Prof. Oswaldo Contreras Medina, el Dr. Ramón Suárez Rodríguez, el Dr. Édgar Dantán González, el Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer, la Mtra. Margotzarit Barrios Damián, el Dr. Fernando Martínez Morales (por sus observaciones en mi seminario realizado en UAEM), la Profa. Lourdes Patricia Sosa Salazar, el Prof. Gustavo Hernández Díaz, el Prof. Gilberto Caro Muñoz, el Prof. Jesús Rosario Orduño Soto, la Profa. Martha Pliego Larrañaga, la Profa. Cecilia Calvillo Fimbres, la Profa. Dinorah Araceli González Gaxiola, la Profa. Armida Amarillas, la Profa. Cristina Zavala, la Profa. Alma Gutiérrez, el Prof. Arturo Alemán, el Prof. Víctor Villa Cruz y el Prof. Alejandro Galaz Martínez, quienes han estado presentes en mi formación y crecimiento en diferentes etapas de mi vida, de quienes también he aprendido muchísimo y me han hecho un mejor estudiante y persona. Siempre me inculcaron buenos valores, me motivaron a seguir adelante y cumplir mis metas en la vida. Junto a mi familia, ustedes han sido mis modelos a seguir. Sinceramente, muchas gracias a todos.

El esfuerzo es la base del éxito.

Víctor Villa Cruz, mi profesor de matemáticas en secundaria.

DEDICATORIA

A Chuy y Ata, mis abuelos. Por su infinito amor, su eterno apoyo, su sincero cariño y dulzura. No sé cómo fueron como padres, pero como abuelos han sido lo mejor del mundo. Siempre han visto por mi bienestar antes que por el suyo, e incluso en momentos difíciles siempre me lo dieron todo aunque eso significara una carencia para ustedes mismos. Sin pensarlo y sin arrepentimiento alguno, para ustedes siempre hemos estado primero nosotros (la familia) antes que ustedes mismos. Jamás se han cansado de dar y dar y dar. Su amor es infinito, sincero e incondicional, lo sé porque todo el tiempo me lo dicen y me lo demuestran. Siempre me han dicho que soy su orgullo, pero pienso que la situación es a la inversa, es decir, mi orgullo son ustedes, porque como abuelos y como personas no tienen comparación. Son los mejores abuelos... Corrección, son los mejores segundos padres que alguien podría tener. Quiero tenerlos siempre a mi lado, llenan mi vida de gozo y felicidad. No imagino una vida sin ustedes. Ata y Chuy, los amo como no tienen idea.

A mi tía Rossy, mi tío Alex y a mis primos, Víctor y Frida. Por su enorme apoyo a lo largo de toda mi vida, su amor y su cariño. Siempre han estado ahí para mí y siempre me han brindado todo su apoyo, tanto en las buenas como en momentos difíciles. Claro que no los veo como mi segunda familia, puesto que todos somos parte de una sola gran y primera familia. Gracias por tratarme como un segundo hijo o como un hermano más. No los veo a diario, pero siempre los tengo presentes en mis pensamientos. Y aunque no lo demuestre, ustedes significan muchísimo para mí, son una parte esencial de mi vida. Sin ustedes me sentiría incompleto. Los amo mucho.

Por su puesto, a mi papá y a mi mamá. A mi mamá, Tere, por darme la vida y por todo su amor y apoyo en todas las decisiones que he elegido; como el amor de mamá no existe ninguno, no hay comparación. Siempre me has dado el ejemplo de que solo se vive una vez y que en esta vida hay que atreverse a todo, sin miedo, importando el cómo te sientes tú contigo mismo más allá de los comentarios negativos de terceros. Me encanta que siempre te atrevas a hacer cosas nuevas, eso es increíble y es de admirarse. Gracias a ti aprendí que la felicidad está compuesta por pequeñas cosas y por pequeños momentos, y que no debo dejar pasar ninguna de esas cosas ni momentos... Vivir el presente. Sé que tu alegría somos mi hermano y yo porque siempre estás pensando en nosotros, y aunque no siempre se puede, tratas de darnos lo mejor. Cuando tienes la oportunidad de tener algo, cualquier cosa, siempre dices "para Manuel, para José Ángel", pensando siempre en nosotros antes que en ti misma. De ti he aprendido que los sentimientos no solo tienen que decirse, sino también demostrarlos. Los sentimientos no pueden quedarse dentro de uno, se tienen que liberar... No puedes (debes) quedarte con nada adentro. Mamá, hoy quiero decirte que has hecho un trabajo maravilloso,

eso jamás lo dudes, que sin ti yo no sería absolutamente nada. Aunque no lo creas, siempre pienso en ti y estás presente en todos mis sueños, y estarás también presente cuando cumpla todos y cada uno de ellos. Como tú no hay ninguna, como mujer y como madre eres excepcional. Este gran paso en mi vida se lo dedico también **a mi papá, Manuel**, por... Por absolutamente todo. Creo que es difícil expresar mi sentir con palabras. Hace poco te hablé de mi clasificación de la gente, en donde las personas se agrupaban en dos grandes categorías (las cuales no mencionaré). Para mí, tú eres la única persona que no entra en esa clasificación. Si bien no eres el mejor ser humano del mundo, a veces te acercas. Desde pequeño me inculcaste buenos valores, y no solo eso, predicas con el ejemplo, no conozco a nadie más honesto y recto que tú. Tampoco conozco a alguien más trabajador, y no solo eso, sino que todo tu esfuerzo siempre ha sido para sacar adelante a la familia... Te desvives por la familia. Nunca interpusiste tus intereses personales, siempre todo fue para nosotros. Siempre has visto por nuestro bienestar y felicidad. No hubo ninguna ocasión en la que hayas visto primero por ti, insisto, siempre fuimos primero nosotros antes que tú. Antes pensaba que la frase "si tú eres feliz, yo también lo soy" era una frase poco sincera, pero no, en tu caso es el sentimiento más puro que existe, de verdad buscas tu felicidad en la nuestra. Por desgracia no existe un premio al mejor papá, pero si existiera, estoy seguro de que te lo darían a ti. No te puedo pedir ni más ni menos, estoy en donde estoy gracias a ti y a mi mamá, esa es la verdad absoluta. Todo lo que soy se lo debo a ustedes. Todo lo que tengo y todo lo que he logrado ha sido gracias a ustedes. Por hacerme llegar hasta aquí y por todo lo que me han dado, este y todos mis triunfos están dedicados a ustedes, por hacerme una persona de bien y poder contribuir a hacer de este mundo un lugar mejor. Por cierto, esto apenas es el comienzo, aún falta mucho camino por recorrer. Los amo más que a nada en todo el mundo.

A José Ángel, mi hermano. Simplemente por ser mí persona favorita en el mundo. A pesar de mi carácter siempre estás conmigo, eso lo aprecio como no tienes idea. Te quiero mucho como mi amigo, y más te amo como mi hermano. Eres una luz... Eres mi luz y mi fuente de energía. "Mijo", ¿qué más te puedo decir? No existe ser humano en la Tierra con un corazón tan noble y tan puro como el tuyo. Eres una persona tan buena que le haces honor a tu nombre: eres un Ángel. No importan las circunstancias, siempre te mantienes como una persona generosa, leal, sincera... No me canso de decirlo, tu corazón es simplemente puro y noble. Tienes una chispa en tu interior que irradia franqueza y no se apaga jamás. Mi vida no sería la misma sin ti. Lo mejor que me ha pasado en esta vida es tenerte a ti y a mis papás. Siempre voy a estar contigo, hasta el final. Te amo, y más que amarte, te adoro con todas mis fuerzas.

Las victorias son sueños que jamás diste por perdidos.

ÍNDICE GENERAL

VOTOS APROBATORIOS	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	6
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
ANTECEDENTES	18
El Género <i>Geobacter</i>	18
Modelo de Estudio: <i>Geobacter sulfurreducens</i>	19
Mecanismos de Transferencia Extracelular de Electrones en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	20
Pili (Nanocables Microbianos).....	21
Citocromos	23
PpcA.....	23
OmcB	23
OmcS	24
OmcE	24
OmcZ.....	24
GSU1334 y MacA	25
Modelo de Transferencia Extracelular de Electrones a los Óxidos de Fe(III)	25
Regulación de la Biogénesis del Pili.....	28
RpoN (Factor σ^{54})	28
Sistema de Dos Componentes PilS-PilR.....	31
Integration Host Factor (IHF)	37
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	46
Objetivo General	46
Objetivos Específicos	46
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	47
Construcción de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$ de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	47
Caracterización de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$ de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	49
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Medios y Condiciones de Cultivo de las Cepas de <i>G. sulfurreducens</i> y <i>E. coli</i>	53
Extracción de ADN Cromosomal de <i>G. sulfurreducens</i> DL-1 e $\Delta ihfA-2$	53

Amplificación por PCR del Gen <i>ihfA-2</i> Flanqueado por sus Regiones Intergénicas.....	54
Amplificación por PCR del Gen <i>ihfA-2</i> ^{deletado} Flanqueado por sus Regiones Intergénicas a Partir del Plásmido pGENR	54
Reacciones de Digestión de ADN	55
Digestión Para Analizar por Electroforesis el Patrón de Restricción.....	55
Digestión Para Purificar el Vector por Electroforesis	55
Digestión Para Deletar un Fragmento del Gen <i>ihfA-2</i>	55
Reacciones de Reparación-Ligación	55
Electroforesis de ADN	56
Purificación de los Vectores y Productos de PCR por Electroforesis	56
Reacciones de Ligación	57
Preparación de Células Competentes de <i>E. coli</i> XL1-Blue y <i>E. coli</i> S17-1 por el Método de CaCl ₂	57
Transformación en <i>E.coli</i> XL1-Blue y <i>E. coli</i> S17-1.....	57
Extracción de ADN Plasmídico.....	58
Conjugación y Cointegración del Vector pHAM en el Cromosoma de <i>G. sulfurreducens</i> DL-1	58
Delección del Gen <i>ihfA-2</i> Mediante Contraselección con Sacarosa/ <i>sacB</i>	59
Cinética de Crecimiento en Medio NBAF	59
Cinética de la Reducción de Fe(III) Soluble/Cuantificación de Fe(II)	59
Extracción y Cuantificación de Proteína Total	60
Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE).....	60
Experimentos de Inmunodetección Tipo “Western Blot”	61
Preparación de Fracciones de Membrana (Purificación Fraccionada de Proteínas)	62
Concentración de Proteínas de Fracciones de Membrana	62
Tinción Hemo (Perfil de Citocromos).....	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
Construcción de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$	64
Amplificación por PCR y Clonación del Gen <i>ihfA-2</i> Flanqueado por sus Regiones Intergénicas	64
Construcción del Plásmido pGENR	66
Construcción del Plásmido pHAM.....	71
Conjugación y Cointegración del Vector pHAM en el Cromosoma de <i>G. sulfurreducens</i> DL-1.....	75
Delección del Gen <i>ihfA-2</i> Mediante Contraselección con Sacarosa/ <i>sacB</i>	79
Caracterización de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$	84
Fenotipo de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$	84

El Producto del Gen <i>ihfA-2</i> Controla la Expresión de Algunos Citocromos Tipo-c.....	88
El Producto del Gen <i>ihfA-2</i> Controla la Producción de Pilina a Nivel Transcripcional....	90
CONCLUSIONES.....	91
PERSPECTIVAS.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	93
APÉNDICES.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Un mecanismo propuesto de transferencia extracelular de electrones por <i>Geobacter sulfurreducens</i>	27
Figura 2. Inicio de la transcripción por las holoenzimas RNAPol- σ^{70} y RNAPol- σ^{54}	30
Figura 3. Organización de un sistema regulador de dos componentes típico.....	32
Figura 4. Organización génica alrededor del sistema de dos componentes PilS-PilR.	33
Figura 5. Organización de los dominios de las proteínas del sistema de dos componentes PilS-PilR.	34
Figura 6. Representación esquemática de la región promotora de <i>pilA</i>	36
Figura 7. Modelo propuesto para la regulación transcripcional de <i>pilA</i> por el sistema de dos componentes PilS/PilR en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	37
Figura 8. Unión de una EBP a un sitio ELE.....	38
Figura 9. Activación de la transcripción bacteriana dependiente de σ^{54}	39
Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína heterodimérica IHF.	40
Figura 11. IHF es codificado por el genoma de <i>Geobacter sulfurreducens</i>	42
Figura 12. Representación esquemática de la región intergénica <i>pilR-pilA</i>	43
Figura 13. Modelo de regulación transcripcional del gen <i>pilA</i> en <i>Geobacter sulfurreducens</i>	44
Figura 14. Región amplificada por PCR.	47
Figura 15. Estrategia para construir la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en <i>G. sulfurreducens</i>	48
Figura 16. Estrategia para caracterizar la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de <i>G. sulfurreducens</i>	50
Figura 17. Amplificación del gen <i>ihfA-2</i> flanqueado por sus regiones intergénicas.....	64
Figura 18. Patrón de restricción del gen <i>ihfA-2</i> flanqueado por regiones intergénicas clonado en pJET1.2/blunt.	66
Figura 19. Patrón de restricción del vector pGEN.	67
Figura 20. Patrón de restricción del plásmido pGENR.	69
Figura 21. Alineamiento de las secuencias del gen <i>ihfA-2</i> silvestre (secuencia 1) y el gen <i>ihfA-2</i> deletado (secuencia 2), flanqueados por sus regiones intergénicas.....	71
Figura 22. Amplificación del gen <i>ihfA-2</i> ^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas con sitios de corte para <i>EcoRI</i> en los extremos, y digestión del vector pK18mobsacB. ...	72
Figura 23. Patrón de restricción del plásmido pHAM.....	74
Figura 24. Patrón de restricción del plásmido pHAM obtenido de la cepa S17-1 de <i>E. coli</i> .75	
Figura 25. Crecimiento de colonias de <i>G. sulfurreducens</i> en medio NBAF-kanamicina ..	76
Figura 26. Comprobación de la cointegración del plásmido pHAM en el cromosoma de <i>G. sulfurreducens</i>	77
Figura 27. Cointegración del plásmido pHAM en el cromosoma de <i>G. sulfurreducens</i>	78

Figura 28. Segunda recombinación homóloga posterior a la cointegración del plásmido pHAM al cromosoma de <i>G. sulfurreducens</i>	80
Figura 29. Crecimiento de colonias de <i>G. sulfurreducens</i> en medio NBAF-Sacarosa	81
Figura 30. Confirmación de la construcción de la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de <i>G. sulfurreducens</i>	83
Figura 31. Fenotipo de las cepas de <i>G. sulfurreducens</i> con diferentes aceptores de electrones.....	85
Figura 32. Posibles sitios de unión de IHF en la región reguladora del operón fumarato reductasa.	87
Figura 33. Perfil de citocromos de las cepas WT y $\Delta ihfA-2$ de <i>G. sulfurreducens</i> crecidas en medio NBAF.	89
Figura 34. Inmunodetección de PilA en <i>G. sulfurreducens</i> DL-1 y su mutante derivada $\Delta ihfA-2$	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Breve descripción de <i>Geobacter sulfurreducens</i> disponible en cultivos puros. ..	20
Tabla 2. IHF participa en la regulación de la expresión genética en bacterias Gram negativas.	41
Tabla 3. Cepas utilizadas en esta investigación.	51
Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta investigación.	52

RESUMEN

Geobacter sulfurreducens es una bacteria del subsuelo capaz de acoplar la respiración anaeróbica a la reducción de metales, tales como el Fe(III), Mn(IV), U(VI), entre otros, mediante la transferencia extracelular de sus electrones. Tal característica ha permitido el uso de esta bacteria para el desarrollo de estrategias de biorremediación y producción de bioelectricidad. En *G. sulfurreducens*, la reducción de metales y la generación de bioelectricidad requieren de varios elementos, entre los que destacan los citocromos tipo-c y un pili conductivo. El pili está constituido por la proteína estructural PilA, cuyo gen (*pilA*) está regulado principalmente por RpoN (factor σ^{54}) y PilR, regulador perteneciente a la familia de las *Enhancer Binding Protein*. La activación transcripcional dependiente de reguladores EBP requiere de proteínas tipo IHF (Integration Host Factor). IHF es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades (α y β). *G. sulfurreducens* posee dos genes que codifican para la subunidad α (*ihfA-1*, *ihfA-2*) y dos genes que codifican para la subunidad β (*ihfB-1*, *ihfB-2*). Antecedentes generados en el laboratorio muestran que las cepas mutantes Δ *ihfA-1*, Δ *ihfB-1* y Δ *ihfB-2* presentan un fenotipo deficiente en crecimiento y reducción de Fe(III), así como también presentan alteraciones en la expresión de la proteína PilA y de algunos citocromos tipo-c importantes en la reducción de metales. En este trabajo, se construyó la cepa mutante Δ *ihfA-2* de *G. sulfurreducens* mediante el sistema pK18mobsacB. La cepa Δ *ihfA-2* presentó una deficiencia en crecimiento y en la reducción de Fe(III) soluble, posiblemente debido a que el producto de este gen se encuentra regulando genes de metabolismo central importantes para el crecimiento de la célula. Así mismo, se observó que la cepa mutante no produce la proteína PilA y es deficiente en cuanto a producir algunos citocromos tipo-c, principalmente aquellos localizados en la membrana externa. Estos resultados demuestran que la proteína IhfA-2 forma parte del complejo IHF, el cual regula de manera positiva la transcripción del gen *pilA*, de varios genes que codifican para citocromos tipo-c y, posiblemente, de varias enzimas importantes para el crecimiento bacteriano.

INTRODUCCIÓN

Varias especies de δ -Proteobacterias son capaces de reducir óxidos metálicos insolubles utilizándolos como aceptores de electrones extracelulares. Estos microorganismos juegan un papel importante en los ciclos del carbono y los minerales en ambientes del subsuelo, sedimentos y depósitos de agua subterránea (Reardon y Mueller, 2013).

Las especies de *Geobacter* son el género de bacterias en el cual se han enfocado las investigaciones para esclarecer los procesos de transferencia extracelular de electrones. Estos microorganismos participan en los ciclos biogeoquímicos de la Tierra, puesto que son capaces de transferir sus electrones a una gran diversidad de compuestos, entre ellos los óxidos de Fe(III) y Mn(IV).

La transferencia extracelular de electrones ha sido ampliamente estudiada en *Geobacter sulfurreducens*, microorganismo que ha cobrado gran importancia debido a que puede ser utilizado en una gran variedad de aplicaciones, entre ellas, la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados en sedimentos acuosos y suelos subterráneos (Lovley, 2003) y la producción de bioelectricidad (Lovley, 2006a; Lovley, 2006b).

Es probable que, después de la reducción de Fe(III) y Mn(IV), la transferencia de electrones a electrodos sea el tipo de respiración más estudiada en las especies del género *Geobacter* (Lovley, 2006a; Lovley, 2006b; Lovley, 2008; Lovley, 2011; Lovley and Nevin, 2011). La habilidad de acoplar la oxidación de compuestos orgánicos con la posterior transferencia de electrones a un electrodo confiere la posibilidad de llevar a cabo nuevas alternativas o estrategias en el campo de la bioenergía, es decir, la producción de bioelectricidad a partir de celdas microbianas de combustible (MFC por sus siglas en inglés) (Lovley, 2006a; Lovley, 2006b). Mediante distintas estrategias de manipulación genética se podría comprender y mejorar dicho proceso, siendo la bioelectricidad una fuente de energía alternativa para el futuro.

Por otra parte, la habilidad de *Geobacter sulfurreducens* para reducir una gran cantidad de metales ha permitido el desarrollo de estrategias para descontaminar ambientes adulterados, entre los cuales destaca la reducción de compuestos que contienen U(VI) (Akob y col., 2008; Brodie y col., 2006; Chandler y col., 2010; Chang y col., 2005; Kerkhof y col., 2011). Tales características hacen que este género de bacterias sea considerado como una herramienta potencial para la mitigación de la contaminación ambiental provocada por la incorporación de metales al medio.

La reducción de metales pesados por parte de *G. sulfurreducens* es de gran importancia, debido a que altera sus propiedades físicas, haciéndolos menos tóxicos o más fáciles de remover. Esta habilidad de reducir iones metálicos solubles a formas menos solubles representa una opción en las diferentes estrategias de biorremediación. De esta manera, los metales pueden ser removidos a través de biorreactores o estimulando la actividad de las especies de *Geobacter in situ* mediante pozos de inyección de acetato (Lovley y col., 2011). La biorremediación tiene el potencial para restaurar ambientes contaminados con metales pesados, pero la carencia de información acerca de los factores que controlan el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos en dichos ambientes limita su implementación (Lovley, 2003). Por lo anterior, es necesario tener avances rápidos sobre el entendimiento de los procesos de biorremediación, conociendo y evaluando la fisiología microbiana, así como abordando estrategias genéticas que ofrezcan la posibilidad de mejorar la capacidad de los microorganismos envueltos en los procesos biorremediadores, tal como la transferencia extracelular de electrones.

La transferencia extracelular de electrones es un proceso complejo e involucra la participación de un filamento tipo pili y de numerosos citocromos tipo-c (Hernández-Eligio y col., 2016b). El pili de *G. sulfurreducens* está conformado principalmente por la proteína estructural PilA y su biosíntesis está sumamente regulada. La transcripción del gen *pilA* está dirigida esencialmente por RpoN (factor σ^{54}) y por la proteína reguladora de respuesta PilR, un regulador tipo EBP (Enhancer binding protein) miembro del sistema de dos componentes PilS/PilR. Para que los activadores transcripcionales tipo EBP puedan activar completamente la transcripción de sus genes blanco, se requiere de proteínas accesorias tipo IHF (Integration host factor) (Hernández-Eligio y col., 2016b).

G. sulfurreducens posee cuatro genes que codifican para cada una de las dos subunidades del complejo IHF (*ihfA-1* e *ihfA-2* codifican para la subunidad α ; *ihfB-1* e *ihfB-2* codifican para la subunidad β). Se sabe que los productos de los genes *ihfA-1*, *ihfB-1* e *ihfB-2* están involucrados directamente en la regulación de la biosíntesis de PilA (Hernández-Eligio y col., 2016b). Debido a los fenotipos observados en las mutantes $\Delta ihfA-1$, $\Delta ihfB-1$ y $\Delta ihfB-2$ de *Geobacter sulfurreducens*, se propone un modelo de regulación donde el complejo IHF participa en la activación transcripcional de los genes involucrados en la transferencia extracelular de electrones (entre los que destacan el gen *pilA* y también algunos genes que codifican para citocromos tipo-c). Dado que solo se han construido y caracterizado tres de las mutantes del complejo IHF, en este trabajo se propone la construcción y caracterización de la cepa mutante $\Delta ihfA-2$, esperando que presente fenotipos similares y/o adicionales a los ya caracterizados, estableciendo así un modelo de

regulación donde el complejo IHF es un regulador global de la transcripción que controla la transferencia extracelular de electrones en *G. sulfurreducens*.

ANTECEDENTES

El Género *Geobacter*

Las especies de *Geobacter* representan un raro ejemplo de microorganismos abundantes, que juegan un papel importante en la biogeoquímica del planeta en una gran diversidad de ambientes y que, además, son cultivables y pueden ser manipulados genéticamente para estudios fisiológicos (Lovley y col., 2011).

Todos los aislados de *Geobacter* tienen forma de bastones con la capacidad de oxidar acetato y reducir Fe(III). Otras características compartidas por este género son la reducción de U(VI), Mn(IV), azufre elemental y sustancias húmicas, en donde la transferencia extracelular de electrones es la característica fisiológica más importante de estos microorganismos (Lovley y col., 2011). De hecho, estudios de genómica comparativa sugieren que el último ancestro común de la familia Geobacteraceae fue un microorganismo capaz de oxidar acetato, con la habilidad de transferir electrones extracelularmente (Butler y col., 2009; Lovley y col., 2011).

Las especies de *Geobacter* son los principales agentes en acoplar la oxidación de compuestos orgánicos y la reducción de óxidos de Mn(IV) y Fe(III) insoluble, desempeñando un rol importante en la biogeoquímica global al participar en los ciclos naturales de la materia orgánica y los metales en suelos y sedimentos (Krushkal y col., 2010). A pesar de que existen otros microorganismos reductores de Fe(III), las especies de *Geobacter* son los microorganismos reductores más abundantes en ambientes donde la reducción de Fe(III) se lleva a cabo de forma activa (Lovley y Phillips, 1988).

Además de desempeñar un rol importante en los ciclos del carbono y los metales en el subsuelo y sedimentos acuáticos, la reducción de Fe(III) y Mn(IV) influencia la geoquímica de esos ambientes mediante la liberación de Fe(II) y Mn(II) solubles, así como fosfatos que son adsorbidos por los óxidos de Fe(III) y Mn(IV) (Lovley y col., 2011). De hecho, los estudios que permitieron el descubrimiento de las primeras especies de *Geobacter* fueron inicialmente diseñados para entender el flujo de fosfatos en sedimentos acuáticos.

Así mismo, las especies de *Geobacter* son capaces de llevar a cabo la transferencia extracelular de electrones a otros metales, reduciéndolos, tales como Tc(III), U(VI) y Co(III) (Lovley y col., 1987; Lovley y col., 1993; Caccavo y col., 1994), así como también a distintos aceptores finales de electrones, tales como antraquinona 2-6 disulfonato (AQDS), sustancias húmicas, nitratos, S⁰, O₂, fumarato, malato, tetracloroetileno, tricloroetileno,

ácido tricloroacético, electrodos, entre otros (Caccavo y col., 1994; Coates y col., 1998; Lin y col., 2004; Lovley, 2008; Lovley, 2011; Lovley y Nevin, 2011).

Las dos especies de *Geobacter* más estudiadas son *G. metallireducens* y *G. sulfurreducens*. *G. metallireducens* fue la primera especie aislada del género (Lovley y Phillips, 1988) y en ella fueron descubiertas algunas características fisiológicas novedosas, como la producción de magnetita (Fe_3O_4) a partir de la reducción de Fe(III). Por su parte, *G. sulfurreducens* es la especie en donde se desarrollaron los primeros métodos para estudios de manipulación genética (Coppi y col., 2001); además, se tiene secuenciado por completo su genoma, por lo que ha servido como modelo de estudio para entender el metabolismo, la regulación de la expresión genética y los procesos de transferencia extracelular de electrones en este género de bacteriano (Lovley y col., 2011; Methé y col., 2003).

Modelo de Estudio: *Geobacter sulfurreducens*

Geobacter sulfurreducens pertenece filogenéticamente a la familia Geobacteraceae, la cual está dentro del dominio Bacteria, filo *Proteobacteria*, clase δ -*Proteobacteria* y orden *Desulfuromonadales*. Esta familia de bacterias habita en el subsuelo y su característica principal es precisamente la transferencia extracelular de electrones, es decir, están especializadas en establecer conexiones eléctricas con aceptores extracelulares de electrones, lo cual les permite desarrollarse en una gran diversidad de nichos y ambientes anaeróbicos (Lovley y col., 2011).

Geobacter sulfurreducens es una bacteria capaz de acoplar la respiración anaeróbica a la reducción de metales (Soto, 2013). Fue aislada por primera vez de sedimentos de fosas contaminadas con hidrocarburos en Norman, Oklahoma (Caccavo y col., 1994).

G. sulfurreducens son bacilos Gram-negativos habitantes de suelos y sedimentos que, hasta hace poco, se pensaba eran anaerobios estrictos, pero hoy día se sabe que son capaces de tener crecimiento en una atmósfera al 5-10% de oxígeno en medios de cultivo (solo después de haber sido enriquecidas previamente con fumarato como aceptor final de electrones, es decir, añadiendo oxígeno una vez que el fumarato se ha agotado) (Lin y col., 2004), capaces de llevar a cabo la oxidación de acetato acoplada a la reducción de Fe(III). Algunos otros aceptores y donadores de electrones comunes, así como diversas características de *Geobacter sulfurreducens*, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Breve descripción de *Geobacter sulfurreducens* disponible en cultivos puros.

Nombre	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
Fuente	-Aguas profundas del subsuelo -Zanjas contaminadas con hidrocarburos
Genoma	-3, 814, 139 pb -%GC= 60.9 (PCA)
Donadores de electrones	-Acetato -H ₂ .Lactato
Aceptores de electrones con Fe(III)	-PCIO* -Fe(III)-cit* -Fe(III)-P*
Otros aceptores de electrones	-Tc(VII) -Co(III) -U(VI) -AQDS* -S ⁰ -O ₂ .Fumarato -Malato -Electrodos -Pd(II) (Dato no publicado)
Temperatura óptima de crecimiento	35 °C

*Abreviaciones: Óxidos de Fe(III) pobremente cristalinos (PLIO), citrato férrico (Fe(III)-cit), pirofosfato férrico (Fe(III)-P), antraquinona- 2,6-disulfonato. (Modificada de Lovley y col., 2011).

Mecanismos de Transferencia Extracelular de Electrones en *Geobacter sulfurreducens*

La transferencia extracelular de electrones es la característica más destacable de las especies de *Geobacter*. Su capacidad de transportar electrones hacia el ambiente extracelular define su importancia ecológica y es también una propiedad fundamental en muchas aplicaciones prácticas. La transferencia extracelular de electrones ha sido estudiada principalmente en *G. sulfurreducens*, la cual posee mecanismos únicos que no han sido descritos en ningún otro organismo ajeno a este género (Lovley y col., 2011).

Pili (Nanocables Microbianos)

Algunas especies de δ -Proteobacterias son capaces de reducir óxidos metálicos insolubles y otros aceptores extracelulares de electrones mediante diversas estrategias, desempeñando un papel importante en los ciclos de los minerales (Reardon y Mueller, 2013). Algunas de esas estrategias incluyen la transferencia directa de electrones vía citocromos multihemo (Shi y col., 2007) y el transporte de electrones a través de mediadores redox solubles, tal como sucede en el género *Shewanella* (Brutinel y Gralnick, 2012).

Sorprendentemente, la capacidad que tienen las especies de *Geobacter* de llevar a cabo la transferencia de electrones a minerales insolubles, electrodos y también a otros microorganismos, es atribuida principalmente a estructuras extracelulares tipo “nanocables microbianos” únicos llamados pilis (Lovley, 2012). Uno de los descubrimientos más importantes sobre la transferencia extracelular de electrones es que el pili de *G. sulfurreducens* (y posiblemente de otras especies de *Geobacter*) conduce los electrones a lo largo de sí mismo con conductividad tipo metálica que, dicho de otra manera, se trata de una estructura eléctricamente conductiva (Malvankar y col., 2011; Reguera y col., 2005).

Uno de los primeros estudios sobre la importancia del pili en la transferencia extracelular de electrones fue llevado a cabo en *G. metallireducens*, donde el pili se expresaba en presencia de óxidos de Fe(III) y Mn(IV), pero no durante el crecimiento en Fe(III) soluble (Childers y col., 2002). Lo anterior sugiere que el pili es una estructura indispensable en el proceso de transferencia de electrones a distancia o de largo alcance hacia los óxidos insolubles de Fe(III) y Mn(IV), no así para la reducción de compuestos solubles.

Múltiples estudios han demostrado que el género *Geobacter* es capaz de producir filamentos tipo pili compuestos por varias proteínas distintas, pero los filamentos conductivos están conformados por la proteína estructural PilA (Klimes y col., 2010). En *G. sulfurreducens*, la delección del gen *pilA* inhibe la reducción de los óxidos de Fe(III) (Reguera y col., 2005), sugiriendo que el pili es una estructura necesaria para la transferencia de electrones a estos compuestos.

Una de las características del pili de *G. sulfurreducens* es que está decorado con el citocromo multihemo OmcS (Lovley y col., 2011). Una hipótesis que rechaza la capacidad conductiva del pili menciona que este último sirve simplemente como un soporte para los citocromos OmcS, y que son estos los que verdaderamente median el transporte de electrones a distancia (Snider y col., 2012).

Sin embargo, en los últimos años, diversas investigaciones han estado encaminadas a demostrar las propiedades conductivas del pili de estos microorganismos (Bonanni y col., 2012; Feliciano y col., 2012; Lovley, 2012; Malvankar y Lovley, 2012; Malvankar y col., 2015; Xiao y col., 2016). Cabe destacar que, mediante la utilización del microscopio de fuerza atómica, se demostró que efectivamente el pili es capaz de conducir la carga eléctrica (Reguera y col., 2005), lo que sugiere que se trata de una estructura capaz de mediar el transporte de electrones de largo alcance. Además, aunque biológicamente el modelo más aceptado para el transporte de los electrones a distancia es el clásico *hopping*, es decir, un arquetipo donde los electrones “saltan” de un citocromo a otro, se sugiere que estos últimos no median el transporte de los electrones a través del pili (Lovley y col., 2011; Reguera y col., 2005), concepto que, a la fecha, sigue siendo cuestionado debido a que no existe un mecanismo de transferencia de electrones a lo largo de filamentos proteicos previamente reportado (Lovley y col., 2011).

De cualquier manera, estudios subsecuentes demuestran las propiedades conductivas de este filamento:

- El pili de *G. sulfurreducens* posee una conductividad comparable a la de algunos polímeros sintéticos, tal como la de la polianilina (Malvankar y col., 2011).
- La mutante *pilA* posee una conductividad despreciable al ser montada sobre un sistema de dos electrodos. En contraste, la cepa silvestre forma una red de pilina que conduce los electrones entre dos electrodos (Malvankar y col., 2011).
- La desnaturalización de los citocromos asociados al pili no tuvo ningún impacto en la conductividad (Lovley y col., 2011).
- La distancia entre los citocromos que decoran el pili (OmcS) es demasiado grande como para permitir el clásico *hopping* de electrones a través de ellos (Leang y col., 2010).
- En una cepa de *G. sulfurreducens* (denominada cepa PA) se sustituyó el gen *pilA* de *G. sulfurreducens* por el de *P. aeruginosa*, la cual posee un pili no conductivo. La cepa PA expresó y ensambló apropiadamente el pili de *P. aeruginosa*, el cual fue decorado con el citocromo OmcS de manera similar a como sucede con la cepa silvestre de *G. sulfurreducens*. Esta cepa fue deficiente en conductividad, producción de corriente y reducción de óxidos de Fe(III), lo cual demuestra que la presencia de citocromos en el pili de *G. sulfurreducens* no es suficiente para conferir conductividad, sugiriendo que existen características estructurales únicas en la proteína PilA de este microorganismo, las cuales son necesarias para la conductividad eléctrica (Liu y col., 2014).

Estudios recientes sugieren que la conductividad tipo metálica del pili de *G. sulfurreducens*, la cual es similar a la de compuestos organometálicos sintéticos, es atribuida a los enlaces dobles conjugados de sus aminoácidos aromáticos constituyentes (Malvankar y col., 2011). Sin embargo, se requiere de muchos más estudios que fundamenten la conductividad tipo metálica de estos nanocables microbianos, pero la posibilidad de un transporte de electrones a lo largo del pili de *G. sulfurreducens* sin la participación de citocromos representa un cambio de paradigma en la biología (Lovley y col., 2011).

Citocromos

Adicional al pili, *Geobacter sulfurreducens* presenta otros elementos involucrados en la transferencia de electrones, los cuales consisten en diversos citocromos tipo-c y proteínas multicobre. Lo anterior no es una contradicción, puesto que, aunque se sugiere que el pili de *G. sulfurreducens* es eléctricamente conductivo y no requiere de la presencia de citocromos para el transporte de electrones a lo largo de sí mismo, estos últimos sí son indispensables en ciertas etapas del proceso de transferencia. Una de las características más destacables de las especies de *Geobacter* es que poseen una abundante cantidad de citocromos tipo-c. A excepción de *G. lovleyi*, las especies de *Geobacter* poseen cerca de 100 citocromos tipo-c por genoma. A pesar de ello, la mayoría de los citocromos están poco conservados entre las especies de *Geobacter* (Butler y col., 2010). La función de los citocromos tipo-c ha sido estudiada en mayor medida en *G. sulfurreducens*, aunque esto en realidad dificulta el hacer generalizaciones acerca de la función de los citocromos en las especies de *Geobacter* (Lovley y col., 2011).

PpcA. Una familia de citocromos tipo-c bien conservada es la de PpcA: citocromos tri-hemo periplásmicos. PpcA purificado de *G. sulfurreducens* tiene un peso molecular de 9.6 kDa y es capaz de reducir Fe(III) y otros metales, aunque por su ubicación periplásmica es improbable que lleve a cabo una reducción directa de Fe(III) (Lloyd y col., 2003). La delección del gen *ppcA* no tiene un efecto en la reducción de fumarato, pero sí un impacto en la reducción de aceptores de electrones extracelulares como Fe(III) y U(VI), utilizando acetato como donador de electrones (Lovley y col., 2011).

OmcB. En estudios tempranos de *G. sulfurreducens* se encontró actividad Fe(III) reductasa en las fracciones membranales, en la cual se ven involucrados citocromos (Gaspard y col., 1988). Uno de esos citocromos fue purificado y denominado OmcB (Leang y col., 2003). Este citocromo tiene un peso molecular de 77 kDa y cuenta con 12 grupos

hemo. La proteína purificada es capaz de reducir óxidos de Fe(III) y Fe(III) quelado. Se encuentra embebido en la membrana externa, con una porción de la molécula expuesta hacia el exterior de la célula (Qian y col., 2007). La delección del gen *omcB* inhibió la reducción de citrato férrico (Citrato de Fe(III)) y de los óxidos de Fe(III). Las mutantes se adaptaron al crecimiento en citrato férrico, pero no al crecimiento en óxidos de Fe(III) (Leang y col., 2003; Leang y col., 2005). La presencia de múltiples genes de citocromos con promotores dependientes de RpoS que se sobreexpresan en presencia de citrato férrico en las mutantes adaptadas sugiere que una respuesta activada de RpoS permite compensar la pérdida de OmcB en *G. sulfurreducens* (Krushkal y col., 2009).

OmcS. Mientras que OmcB está embebido en la membrana externa, algunos citocromos tipo-c de *G. sulfurreducens* están completamente expuestos en la superficie de la célula. Tal es el caso de OmcS, un citocromo tipo-c de seis grupos hemo, con un peso molecular de 45 kDa (Qian y col., 2011). El gen *omcS* es el más sobreexpresado durante el crecimiento en óxidos de Fe(III), no así en citrato férrico (Holmes y col., 2011). También está altamente expresado durante el crecimiento en electrodos (Holmes y col., 2006). OmcS purificado es capaz de reducir una diversidad de aceptores extracelulares de electrones en *G. sulfurreducens*, incluyendo óxidos de Fe(III), U(VI) y sustancias húmicas (Qian y col., 2011). Como se mencionó anteriormente, OmcS está específicamente asociado al pili (Leang y col., 2010) y es requerido para el crecimiento en óxidos de Fe(III), pero no para el crecimiento en citrato férrico (Mehta y col., 2005).

OmcE. OmcE es otro citocromo tipo-c encontrado en la superficie de la célula, pero su localización específica aún no ha sido determinada con precisión. Tampoco ha sido purificado, pero se predice que tiene un peso molecular de 32 kDa y cuatro grupos hemo (Mehta y col., 2005). Sus patrones de expresión, así como estudios de delección, sugieren que juega un papel importante en la transferencia extracelular de electrones en las cepas silvestres, sin embargo, las cepas mutantes pueden adaptarse a la pérdida de OmcE (Mehta y col., 2005).

OmcZ. En contraste con OmcS y OmcE, OmcZ no es requerido para la reducción de Fe(III) insoluble (óxidos de Fe(III)). De los citocromos estudiados hasta el día de hoy, solamente OmcZ es absolutamente necesario para la producción de corriente de alta densidad (Nevin y col., 2009). OmcZ tiene un peso molecular de 49 kDa y posee cuatro grupos hemo. La proteína purificada puede reducir una diversidad de aceptores de electrones extracelulares incluyendo óxidos de Mn(IV), pero reduce pobremente los óxidos de Fe(III) (Holmes y col., 2011). OmcZ se localiza específicamente en la interface *biofilm*-ánodo (Inoue y col., 2011), no está asociado con filamentos y sus patrones de expresión

sugieren que su función natural podría ser promover la reducción de aceptores de electrones extracelulares solubles (Lovley y col., 2011).

GSU1334 y MacA. El citocromo codificado por el gen GSU1334 es homólogo a OmcZ, y su delección presenta defectos en la reducción de óxidos de Fe(III) y U(VI) (Shelobolina y col., 2007a). De manera similar, la delección del gen que codifica para MacA (un citocromo tipo-c ubicado en la membrana interna, de mucho interés debido a que se encuentra altamente expresado durante el crecimiento en Fe(III)), inhibió la reducción de óxidos de Fe(III) (Butler y col., 2004).

Aunque *G. sulfurreducens* produce una abundante cantidad de citocromos tipo-c, se ha encontrado que estos no contribuyen al transporte de electrones de largo alcance a través del pili, sin embargo, son importantes en la transferencia de carga hacia los óxidos de Fe(III), electrodos y otros aceptores de electrones, así como también en la conducción de la carga desde la membrana interna hasta llegar a la membrana externa (Lovley y col., 2011).

Modelo de Transferencia Extracelular de Electrones a los Óxidos de Fe(III)

Modelos tempranos de la reducción de los óxidos de Fe(III) en *G. sulfurreducens* sugerían que ésta liberaba citocromos tipo-c de bajo peso molecular, los cuales actuaban como lanzaderas/transportadores entre las células y los óxidos de Fe(III) (Seeliger y col., 1998). No obstante, este concepto ha sido refutado en diversos estudios y se propone un contacto directo entre las células y los óxidos de Fe(III) para llevar a cabo su reducción (Lovley y col., 2011). Evidencia consistente del contacto directo es la ausencia de reducción de Fe(III) cuando las células están separadas de los óxidos contenidos dentro de perlas microporosas de alginato o agar (Nevin y Lovley, 2000).

A pesar de que se conocen algunos elementos necesarios en la transferencia de electrones a los óxidos de Fe(III), el cómo actúan en conjunto aún no se entiende por completo (Lovley y col., 2011). Como se dijo anteriormente, probablemente OmcS tenga un papel importante en la reducción de los óxidos de Fe(III), debido a lo siguiente:

- OmcS se sobreexpresa durante el crecimiento en óxidos de Fe(III) (Holmes y col., 2011).
- Estudios de delección indican que OmcS es requerido para la reducción de los óxidos de Fe(III) (Mehta y col., 2005).

- OmcS está específicamente asociado al pili, el cual es eléctricamente conductivo y es requerido para la reducción de los óxidos de Fe(III) (Leang y col., 2010).
- OmcS purificado puede transferir electrones a los óxidos de Fe(III) (Qian y col., 2011).

La explicación más simple para esas observaciones es que los electrones son transportados a través del pili y transferidos a los óxidos de Fe(III) vía OmcS. No existe una ruta evidente para la llegada de los electrones a OmcS excepto el pili, además, la falta de reducción de Fe(III) en ausencia de OmcS sugiere que los electrones no pueden ser transferidos directamente del pili a los óxidos de Fe(III) (Lovley y col., 2011).

Se desconoce la manera en que los electrones son transferidos al pili (Lovley y col., 2011). Este proceso podría tomar lugar en el periplasma o incluso en la membrana interna, pero el requerimiento de OmcB, el cual está localizado en la membrana externa (Qian y col., 2007), sugiere que la transferencia de electrones cerca de la superficie de la célula es más probable. Empero, el hecho de que OmcB esté embebido en la membrana externa sugiere que podría ser difícil para OmcB y el pili asociarse lo suficientemente cerca para permitir la transferencia de electrones entre ellos. La necesidad de mediar la transferencia de electrones de OmcB al pili en la superficie de la célula podría explicar por qué otras proteínas redox, tales como citocromos tipo-c y las proteínas multicobre OmpB y OmpC, son importantes para la reducción de los óxidos de Fe(III) (Lovley y col., 2011).

Dado que OmcB es el conducto para los electrones hacia el exterior de la célula y hasta el pili, surge la necesidad de un donador de electrones para OmcB. Es probable que esto sea llevado a cabo por citocromos del periplasma, transportando los electrones derivados del metabolismo central de *G. sulfurreducens* (ver apéndice) desde la membrana interna hasta la membrana externa. Como se mencionó anteriormente, se conocen algunos citocromos periplásmicos, pero la transferencia de electrones entre ellos y OmcB o cualquier otro aceptor no ha sido documentada (Lovley y col., 2011). En la Figura 1 se esquematiza un diagrama propuesto para la transferencia de electrones en *G. sulfurreducens*.

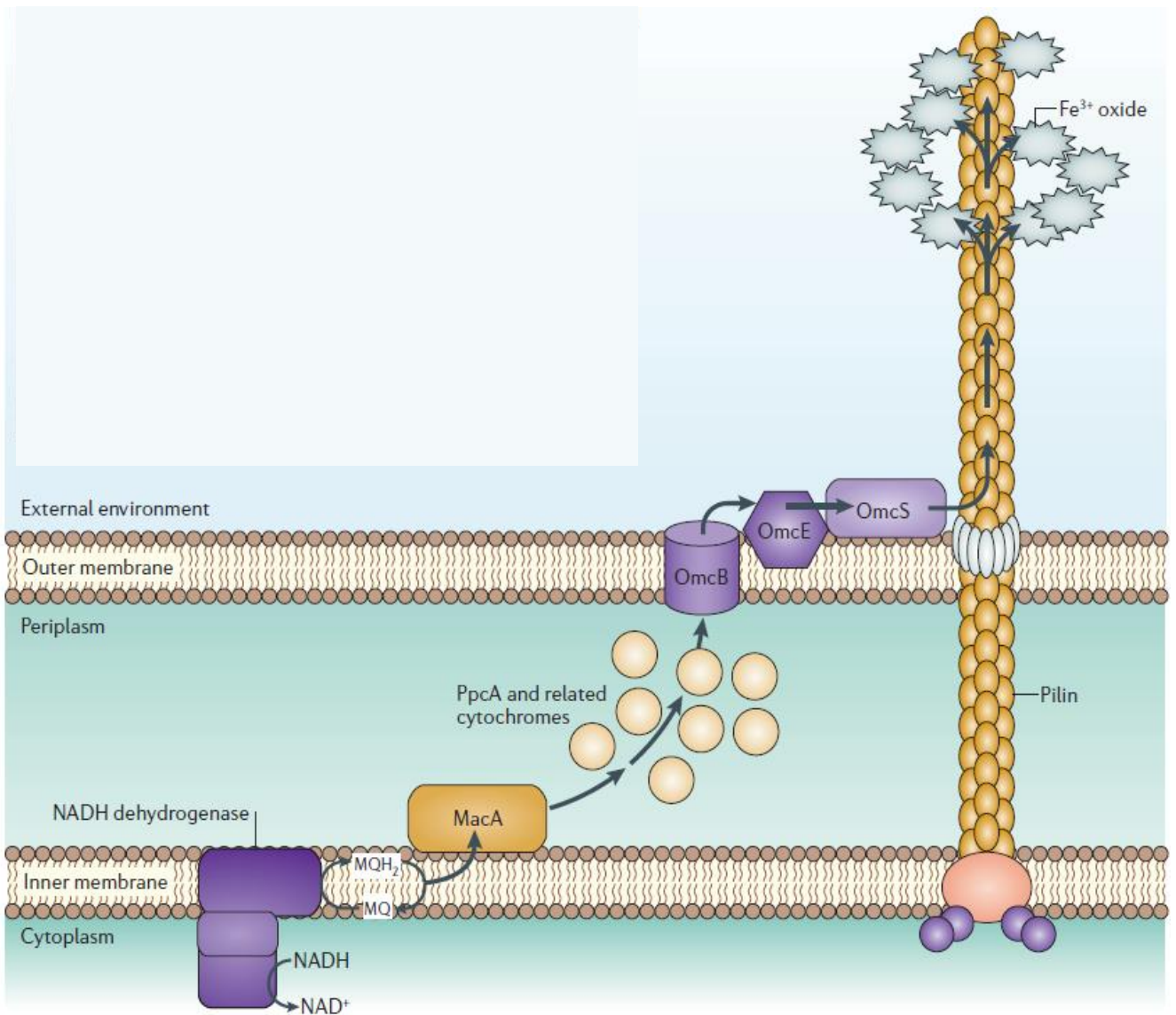


Figura 1. Un mecanismo propuesto de transferencia extracelular de electrones por *Geobacter sulfurreducens*. MacA, PpcA, OmcB, OmcE y OmcS son citocromos tipo-c. El flujo de electrones propuesto entre citocromos está basado en su localización reportada dentro de la bacteria. MQH₂, menaquinol; MQ, menaquinona. (Modificada de Lovley, 2006a).

Regulación de la Biogénesis del Pili

Debido a que el pili de *Geobacter sulfurreducens* y otras especies de la familia Geobacteraceae es filogenética y funcionalmente distinto a los pili tipo IV de otras bacterias, la proteína PilA es conocida como Geopilina (Reguera y col., 2005). La biogénesis del pili involucra varios genes, entre ellos *pilA*, que codifica para la proteína estructural PilA, mientras que *pilB*, *pilT* y *pilC* están envueltos en la secreción y el ensamblaje del pili (Juárez y col., 2009). Debido a que el pili es indispensable en la transferencia extracelular de electrones tanto en los ciclos biogeoquímicos como en la producción de bioelectricidad y la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, es de vital interés conocer los mecanismos envueltos en la biogénesis del pili y la regulación de su expresión génica. Para efectos de este trabajo, nos centraremos solamente en la regulación de la transcripción del gen *pilA* como modelo de estudio en la transferencia de electrones. La transcripción de *pilA* está dirigida principalmente por el factor σ^{54} (RpoN) y la proteína reguladora de respuesta PilR, perteneciente a la familia de las EBP's (Enhancer Binding Protein), y cuyas redes regulatorias están apenas siendo elucidadas (Hernández-Eligio y col., 2016a; Hobbs y col., 1993; Ishimoto y Lory, 1989; Ishimoto y Lory, 1992; Kehl-Fie y col., 2009; Wu y Kaiser, 1997). Aquí presentamos algunos reguladores globales estudiados hasta ahora.

RpoN (Factor σ^{54})

Los factores sigma (σ) bacterianos confieren especificidad genética a la RNA polimerasa (RNAPol), la enzima central que cataliza la transcripción. La RNA polimerasa bacteriana consiste estructuralmente en un centro catalítico conservado (compuesto por las subunidades $\alpha\alpha'\beta\beta'\omega$) y una subunidad intercambiable, el factor σ , el cual es responsable de conferir especificidad por el promotor y direccionar la holoenzima RNAPol resultante (compuesta por las subunidades $\alpha\alpha'\beta\beta'\omega\sigma$, denotada como $E\sigma$) a promotores de genes específicos durante el inicio de la transcripción, un proceso bastante complejo (Wigneshweraraj y col., 2008). Los factores sigma (σ) juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica en respuesta a cambios ambientales, y las bacterias emplean múltiples factores sigma para optimizar esas respuestas. Cada tipo de factor sigma reconoce secuencias específicas de los elementos promotores de ciertos conjuntos de genes y promueven el inicio de la transcripción (Lovley y col., 2011). El genoma de *G. sulfurreducens* codifica homólogos de RpoD (σ^{70}), RpoS (σ^S , σ^{38}), RpoH (σ^H , σ^{32}), RpoN (σ^N , σ^{54}), RpoE (σ^E , σ^{24}) y FliA (RpoF, σ^F , σ^{28}) encontrados en *E. coli* y muchas otras bacterias (Methé y col., 2003).

En muchas otras bacterias, RpoD (σ^{70}) es generalmente el principal factor sigma encargado de la transcripción de genes *housekeeping* (Ishihama, 2000), mientras que los factores sigma alternativos son requeridos para la expresión de genes de respuesta a diferentes tipos de estrés o señales (Lovley y col., 2011).

En contraste a la mayoría de las bacterias, en donde RpoN (σ^{54}) es indispensable solo en ciertas condiciones (deficiencia de nitrógeno, por ejemplo), este factor sigma es de importancia vital para muchas δ -Proteobacterias (Juárez y col., 2009), incluyendo a *G. sulfurreducens* (Lovley y col., 2011). Estudios computacionales y análisis transcriptómicos demuestran que RpoN regula una gran cantidad de genes envueltos en una gran diversidad de funciones celulares, incluyendo aquellos que codifican para enzimas encargadas de la asimilación de amoníaco, por lo que se predice que este factor sigma es esencial bajo todas las condiciones de crecimiento en *G. sulfurreducens* (Leang y col., 2009). RpoN también regula genes importantes para el crecimiento en ambientes del subsuelo o la producción de electricidad en celdas microbianas de combustible (MFC, microbial fuel cells), tales como biosíntesis del flagelo, citocromos tipo-c y biosíntesis del pili (Lovley y col., 2011). La transcripción del gen *pilA* en *G. sulfurreducens* es conducida por la RNA polimerasa dependiente de RpoN (Juárez y col., 2009).

RpoN es sustancialmente distinto a la familia de factores tipo RpoD. Durante el inicio de la transcripción, el factor σ direcciona la unión de la RNAPol al promotor, formándose un complejo inicial $E\sigma$ -promotor, llamado complejo cerrado (CC), en el cual el DNA permanece aún en una conformación *duplex* (Bush y Dixon, 2012). RpoD direcciona a la RNAPol a promotores con secuencias conservadas en posiciones a -35 y -10 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de transcripción (sitio +1); mientras que RpoN dirige su RNAPol a promotores caracterizados por secuencias conservadas a -24 y -12 pb río arriba del sitio +1, como se muestra en la Figura 2 (Wigneshweraraj y col., 2008).

La regulación de la transcripción de promotores dependientes de $E\sigma^{70}$ ocurre a nivel de la formación del complejo cerrado. Los activadores transcripcionales pueden acarrear a $E\sigma^{70}$ hacia el promotor o alterar la conformación del DNA en esta región para permitir una formación eficiente del CC. Los represores transcripcionales bloquean el acceso de $E\sigma^{70}$ al promotor. En marcado contraste, la formación del CC en promotores dependientes de $E\sigma^{54}$ ocurre siempre, independientemente de otros factores (Browning y Busby, 2004).

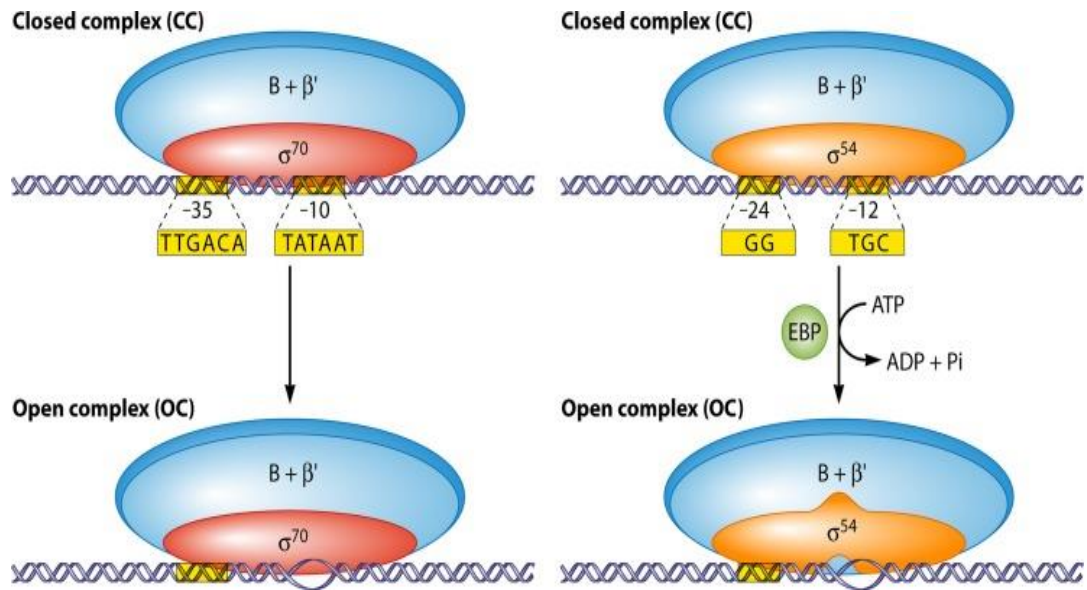


Figura 2. Inicio de la transcripción por las holoenzimas RNAPol- σ^{70} y RNAPol- σ^{54} . El factor σ^{70} dirige la unión de la RNAPol hacia las secuencias consenso -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) para formar el complejo cerrado (CC) desfavorecido energéticamente, el cual es convertido fácilmente en un complejo abierto (OC) al iniciar la transcripción. En contraste, el factor σ^{54} dirige la unión de la RNAPol hacia las secuencias consenso -12 (TGC) y -24 (GG), formando un complejo cerrado energéticamente favorecido que rara vez se isomeriza a complejo abierto. En este caso, para formar la burbuja de transcripción, una proteína especializada tipo EBP (Enhancer binding protein) debe interactuar con el factor σ^{54} y usar la energía de la hidrólisis del ATP para reestructurar la holoenzima. No se muestran las subunidades α y ω . (Extraída de Bush y Dixon, 2012).

El CC suele tener una vida media corta en los promotores dependientes de σ^{70} , y se disocia o isomeriza espontáneamente a un estado conocido como complejo abierto (OC) (Figura 2), en el cual, las hebras del DNA promotor están separadas localmente, de tal forma que el sitio +1 de cadena sencilla esté posicionado en la hendidura catalítica de la RNAPol para permitir el inicio de la síntesis de RNA (Wigneshweraraj y col., 2008).

En contraste, el factor σ^{54} impone una restricción cinética y termodinámica en la formación del OC por la RNAPol, por lo que el $E\sigma^{54}$ -CC asume inicialmente una conformación que no se isomeriza espontáneamente. La conversión de $E\sigma^{54}$ -CC a OC es un proceso activo que consume ATP, por lo que requiere de activadores transcripcionales con actividades de ATPasas (Figura 2). La familia de las proteínas tipo EBP (*Enhancer Binding Protein*) contienen dominios de ATPasas, las cuales, en respuesta a ciertas cascadas de señalización, se unen al factor σ^{54} e inducen rearrreglos conformacionales en el $E\sigma^{54}$ -CC

(Wigneshweraraj y col., 2008). Las EBP funcionan eliminando un conjunto de interacciones nucleoproteicas que existen en el σ^{54} -CC utilizando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP, reestructurando al factor σ^{54} y permitiendo de esta manera la formación del OC y la burbuja de transcripción (Cannon y col., 2000).

Estos activadores transcripcionales dependientes de RpoN desempeñan un papel importante en δ -Proteobacterias, puesto que, como se dijo, este factor sigma está involucrado en muchas de las funciones vitales en estos microorganismos, lo que indicaría que un gran número de EBP's están presentes en este linaje de bacterias. El genoma de *G. sulfurreducens* es consistente con esta afirmación, puesto que codifica un total de 28 EBP's, una proporción bastante alta respecto al tamaño total de su genoma (Tabla 1), superada solamente por *Myxococcus xanthus* (Karlin y col., 2006). Frecuentemente, los activadores transcripcionales tipo EBP dependientes de σ^{54} forman parte de sistemas reguladores de dos componentes, los cuales responden a señales ambientales e intracelulares.

Sistema de Dos Componentes PiS-PiR

Las especies de *Geobacter* poseen uno de los números más altos en proteínas de señalización, incluyendo sistemas de dos componentes (TCS por sus siglas en inglés: two-component system), lo que refleja el potencial adaptativo de estos organismos (Galperin, 2005). Los genomas de las especies de *Geobacter* contienen un inusual gran número de genes que codifican para sistemas de dos componentes (Methé y col., 2003). Los TCS son los mecanismos moleculares de transducción de señales más ampliamente distribuidos mediante los cuales las bacterias responden a cambios en el ambiente (Hernández-Eligio y col., 2016a). Un TCS típico (Figura 3) consiste en una proteína sensora histidina cinasa (HK) unida a la membrana, la cual detecta cambios en el ambiente, y una proteína citosólica reguladora de respuesta (RR), la cual generalmente influencia la expresión genética necesaria para la adaptación a esos cambios (Egger y col., 1997). Bajo un estímulo ambiental, la proteína HK se autofosforila en un residuo de Histidina conservado. Este grupo fosfato de alta energía es luego transferido a un residuo de Aspartato conservado en la proteína RR correspondiente, resultando en la forma activa de este regulador transcripcional (forma activa fosforilada) (Mitrophanov y Groisman, 2008). En otras bacterias, los sistemas de dos componentes suelen estar localizados en un mismo operón, pero frecuentemente este no es el caso de las especies de *Geobacter* (Lovley y col., 2011).

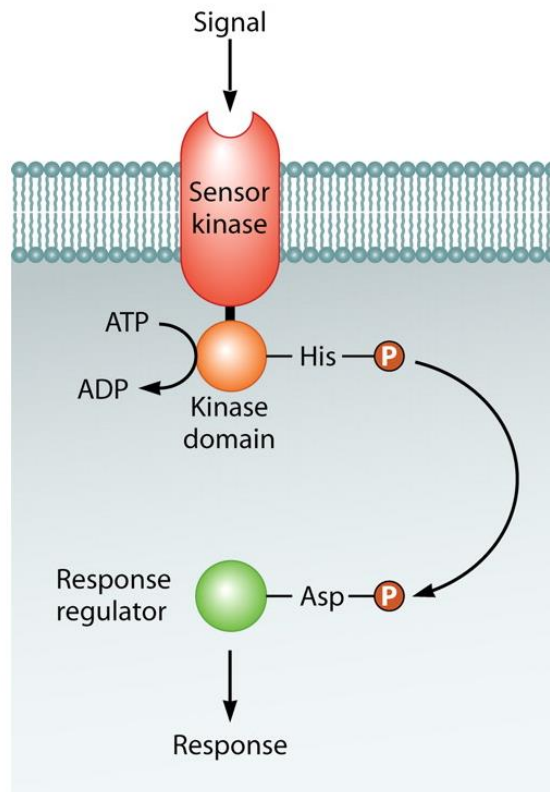


Figura 3. Organización de un sistema regulador de dos componentes típico. El TCS se compone por una histidina cinasa (HK) que se autofosforila en un residuo de histidina conservado en respuesta a una señal ambiental. La HK interactúa con el dominio receptor de la proteína reguladora de respuesta (RR), catalizando la transferencia del grupo fosfato a un residuo de aspartato conservado dentro del dominio receptor. La fosforilación activa a la proteína RR, resultado de un cambio conformacional que contribuye a mediar diversas actividades biológicas, tales como la unión al DNA y la regulación transcripcional. (Extraída de Bretl y col., 2011).

Un sistema de dos componentes importante en *G. sulfurreducens* es el sistema PilS-PilR, el cual regula una gran cantidad de procesos en este microorganismo, pero especialmente regula la expresión de *pilA*, el gen de la proteína estructural pilina (Juárez y col., 2009). Se ha visto que los productos de los genes *pilS* y *pilR* también funcionan como un TCS que modulan la expresión de *pilA* en otros géneros de bacterias, tales como *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Dichelobacter*, *Myxococcus* y *Kingella* (Juárez y col., 2009; Kehl-Fie y col., 2009), en donde la transcripción del gen *pilA* está conducida por la RNA polimerasa dependiente del factor σ alternativo RpoN (Factor σ^{54}) (Juárez y col., 2009), que como se mencionó anteriormente, requiere de la acción de una proteína tipo EBP para su activación completa (Morett y Segovia, 1993).

En *G. sulfurreducens*, este sistema de dos componentes se encuentra localizado cromosomalmente en una agrupación de genes que contiene a *pilT* (GSU1492), *pilC* (GSU 1493), *pilS* (GSU1494), *pilR* (GSU1495) y *pilA* (GSU1496), como se muestra en la Figura 4 (Methé y col., 2003). Un arreglo similar también es encontrado en otros miembros de la familia Geobacteraceae y δ -Proteobacterias como *Myxococcus xanthus* (Wu y Kaiser, 1997).

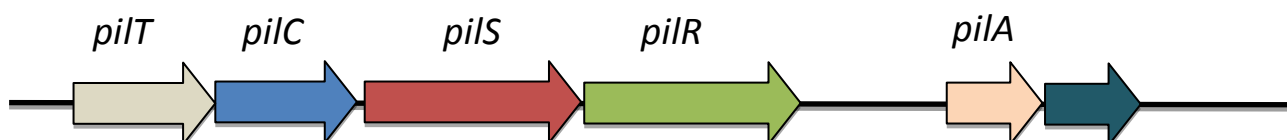


Figura 4. Organización génica alrededor del sistema de dos componentes PilS-PilR. (Extraída de Hernández-Eligio y col., 2016a).

PilS es la proteína sensora histidina cinasa (HK). Es una proteína de 550 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 60.3 kDa, la cual posee la topología canónica de otras proteínas HK (Figura 5) (Hernández-Eligio y col., 2016a).

PilS de *G. sulfurreducens*, así como otras proteínas sensoras HK, consiste en un dominio N-terminal transmembrana (con cinco motivos transmembranales) más una gran región C-terminal citoplasmática, la cual posee tres dominios conservados: el sensor PAS (involucrado también en la detección de un gran número de estímulos), el dominio Histidina-Cinasa HK y el dominio de unión a nucleótido HATPasa (Figura 5). Bajo ciertos estímulos ambientales, PilS detecta una señal (aún desconocida) y se autofosforila en un residuo de Histidina conservado (His-334) dentro del dominio HK. Un sistema de dos componentes requiere que su proteína sensora se autofosforile y luego transfiera su grupo fosfato a una proteína reguladora de respuesta (RR). PilS transfiere su grupo fosfato a su correspondiente proteína RR PilR en un residuo de Aspartato conservado (Asp-53) para dar lugar a su forma activa, encargada de activar o reprimir la expresión génica (Hernández-Eligio y col., 2016a).

Cabe destacar que, probablemente, PilS además de su actividad cinasa, podría poseer también una actividad fosfatasa poco común (Hernández y col., 2016a). La actividad fosfatasa de algunas proteínas HK podría contribuir a la modulación de la actividad de su proteína RR correspondiente (Zapf y col., 1988).

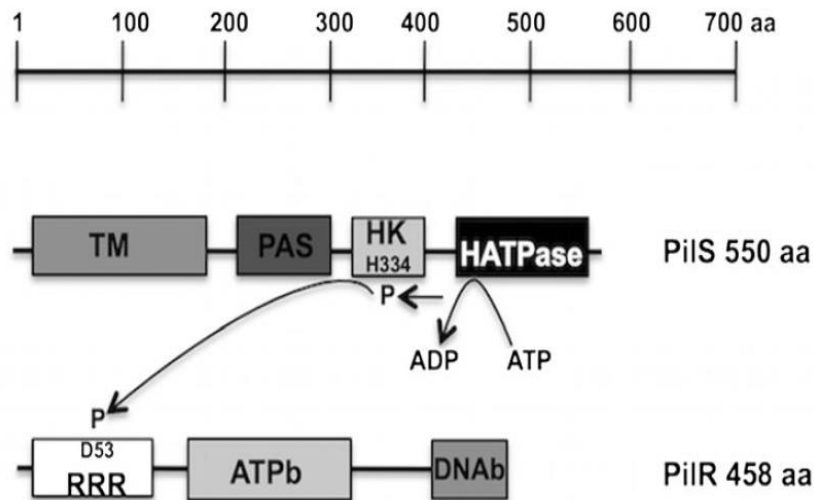


Figura 5. Organización de los dominios de las proteínas del sistema de dos componentes PiIS-PiIR. TM, región transmembrana; PAS, dominio PAS; HK, módulo histidina cinasa; HATPase, dominio ATPasa (*Histidine Kinase-like ATPase domain*); RRR, dominio receptor regulador de respuesta; ATPb, dominio de unión a ATP; DNAb, dominio de unión a DNA. Se muestran los residuos aceptores de grupos fosfato. (Extraída de Hernández-Eligio y col., 2016a).

PiIR, por su parte, es la proteína reguladora de respuesta de PiIS, y pertenece además a la familia de los activadores transcripcionales tipo EBP dependientes del factor σ^{54} (Juárez y col., 2009). El análisis de la secuencia de aminoácidos de PiIR identificó tres dominios encontrados típicamente en otras proteínas tipo EBP (Figura 5): un dominio N-terminal envuelto en señales regulatorias (en este caso un dominio receptor también presente en sistemas de dos componentes, que contiene el aminoácido conservado Aspartato-53 envuelto en la regulación de su actividad por fosforilación), un dominio central ATPasa responsable de la activación de la transcripción y de la interacción con RpoN, y un dominio C-terminal con un motivo de unión a DNA tipo hélice-giro-hélice (Morett y Segovia, 1993). Debido a las características de esta proteína RR como EBP y a una activación de la expresión del gen *pilA* dependiente del factor σ^{54} , además de la cercanía en el genoma entre los genes *pilR* y *pilA*, era casi concluyente que PiIR, como parte del sistema de dos componentes con PiIS, activaba la transcripción de *pilA*.

En estudios tempranos realizados por la Dra. Juárez y colaboradores, una cepa mutante de *G. sulfurreducens* deficiente en PiIR (deleción del gen *pilR*) mostró un fenotipo disminuido en la reducción de los óxidos de Fe(III) y en aglutinación (una propiedad inherente al pili), similar a lo que sucede con la mutante en *pilA* (deleción del gen *pilA*).

Además, se comprobó que la expresión del gen *pilA* se encontraba disminuida en la mutante deficiente en PilR, lo que demuestra que PilR regula de manera directa la transcripción del gen *pilA* (Juárez y col., 2009).

Cabe destacar que la mutante en *pilR* mostró también un fenotipo afectado en la reducción de Fe(III) soluble (que no requiere pili), lo que probablemente se deba a una deficiencia en el citocromo de membrana externa OmcB mostrada en esta mutante, por lo que se sugiere que PilR está involucrada también en la regulación de la transcripción de este y otros citocromos (Juárez y col., 2009).

Estudios bioinformáticos predicen que en el genoma de *G. sulfurreducens* existen 523 sitios de unión para PilR, de los cuales 213 están localizados río arriba y en la misma orientación de genes que codifican para alguna proteína, entre ellos el gen *pilA* (Krushkal y col., 2010). Estos estudios computacionales muestran un sitio de unión putativo de PilR, denominado como BS1, río arriba del sitio de inicio de transcripción de *pilA*: una secuencia de 16 nucleótidos (GGCAAATTTGGCATG) centrada en las posiciones -207 a -192 (Krushkal y col., 2010). Experimentos posteriores demostraron la existencia del sitio BS1 y de una región adicional, denominada BS2, como sitios de unión a PilR. Este segundo sitio corresponde a una secuencia de 16 nucleótidos (GACGAAAATCGTCAGA) centrada en las posiciones -167 a -152. Esto demuestra que PilR activa la transcripción de *pilA* uniéndose específicamente a su región promotora, la cual contiene los sitios BS1 y BS2 (Hernández-Eligio y col., 2016a), tal como se muestra en la Figura 6.

En otros organismos en donde el sistema de dos componentes PilS-PilR ha sido estudiado, tales como *P. aeruginosa*, *Moraxella lacunata*, *Moraxella bovis*, *Myxococcus xanthus* y *Kingella kingae*, PilS fosforila a PilR, y PilR fosforilada es la forma activa de la proteína, responsable de la activación de *pilA* (Hernández-Eligio y col., 2016a; Hobbs y col., 1993; Ishimoto y Lory, 1989; Ishimoto y Lory, 1992; Kehl-Fie y col., 2009; Wu y Kaiser, 1997). Sin embargo, en marcado contraste, estudios recientes en *G. sulfurreducens* demuestran que es la forma no fosforilada de PilR la encargada de activar la transcripción de *pilA* (Hernández-Eligio y col., 2016a). De cualquier manera, no se trata de un caso aislado. Se han reportado algunos casos en donde proteínas RR de sistemas de dos componentes activan la expresión de sus genes blanco en su estado no fosforilado, tales como *Bacillus subtilis* (un TCS envuelto en la formación de biofilms), *P. aeruginosa* (un TCS involucrado en la producción del exopolisacárido alginato) y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (formación de biofilms) (Kobayashi, 2007; Ma y col., 1998; Zakikhany y col., 2010).

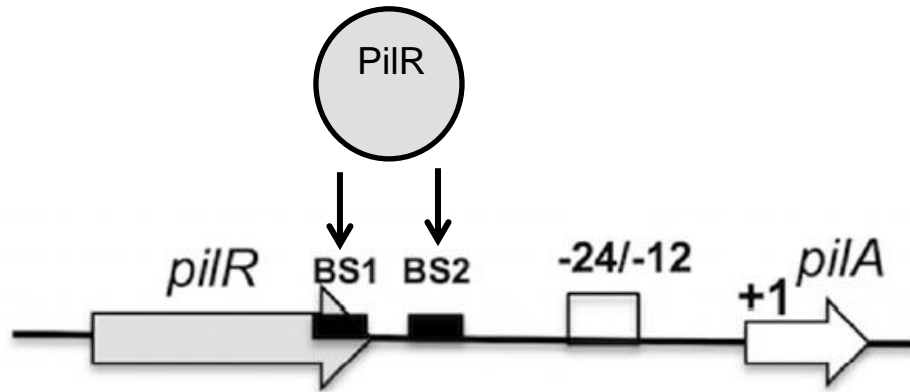


Figura 6. Representación esquemática de la región promotora de *pilA*. PiIR se une a la región promotora del gen *pilA*, activando su transcripción. Se muestran los sitios de unión a PiIR BS1 y BS2, así como los elementos $-24/-12$ reconocidos por el factor σ^{54} . (Modificada de Hernández-Eligio y col., 2016a).

Por tanto, la activación transcripcional del gen *pilA* por el sistema de dos componentes PiIS-PiIR de *G. sulfurreducens* difiere de sus homólogos caracterizados en otras bacterias. Esta diferencia podría ser resultado de la diversidad de hábitats que colonizan estas bacterias, diversidad metabólica y características funcionales del pili. Una cuestión importante es que el estado de fosforilación de algunas proteínas RR puede tener una influencia en la selectividad de sus genes diana, lo cual podría estar sucediendo con PiIR de *G. sulfurreducens*, por lo que se requiere de más estudios para elucidar el efecto del estado de fosforilación de PiIR en la regulación transcripcional de otros genes blanco (Hernández-Eligio y col., 2016a).

Tomados en conjunto, estos datos han servido para proponer un modelo de regulación de la expresión del gen *pilA* controlado por el sistema de dos componentes PiIS-PiIR y el factor σ^{54} . La proteína HK PiIS detecta una señal ambiental (desconocida) y autofosforila su Histidina-334. PiIS~P transfiere su grupo fosfato al Aspartato-53 de la proteína RR PiIR, sin embargo, como se dijo, es la forma no fosforilada de PiIR quien activa la transcripción de *pilA* uniéndose en los sitios BS1 y BS2 en la región intergénica de *pilR-pilA*, un proceso dirigido por la RNAPol dependiente de σ^{54} , tal como se muestra en la Figura 7. En adición, se piensa que la actividad fosfatasa de PiIS podría modular la función de PiIR (Hernández-Eligio y col., 2016a).

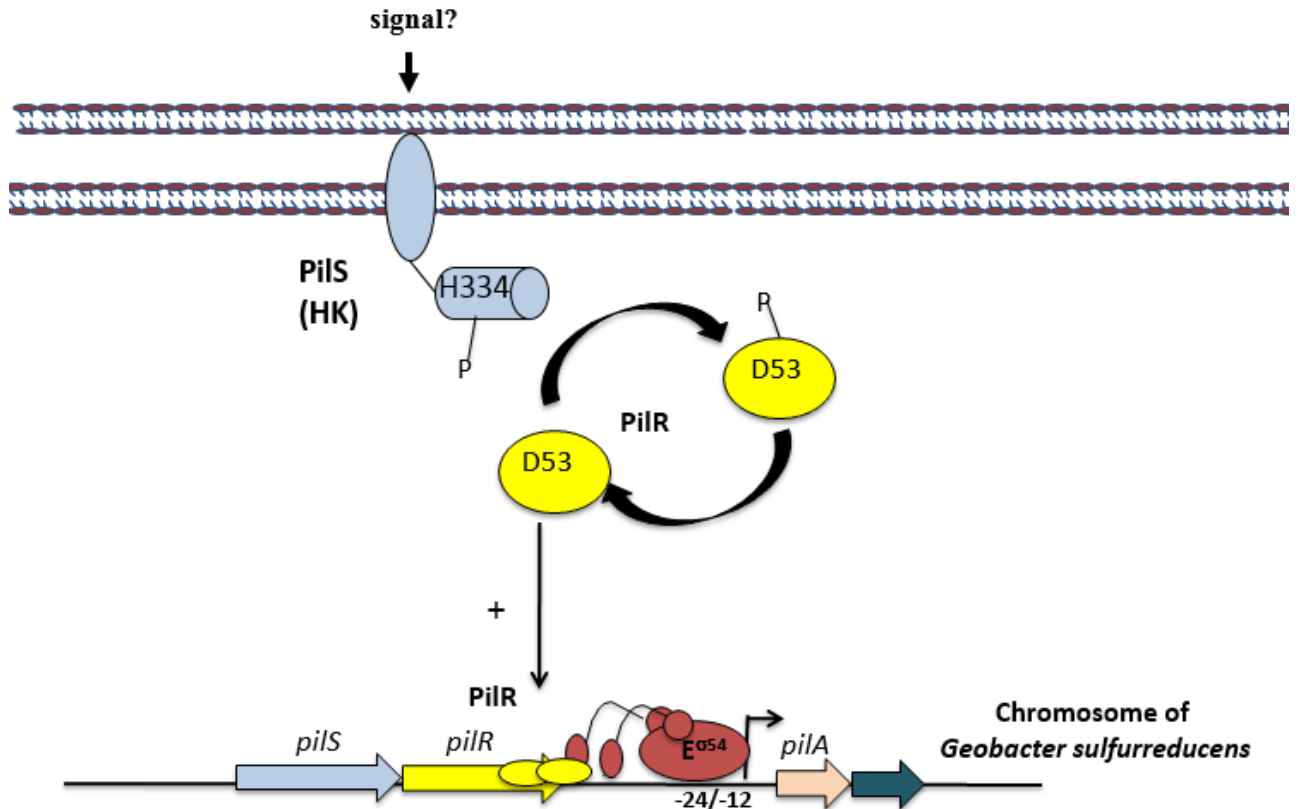


Figura 7. Modelo propuesto para la regulación transcripcional de *pilA* por el sistema de dos componentes PiIS/PiIR en *Geobacter sulfurreducens*. PiIS se autofosforila en el residuo histidina 334 (H334) y transfiere su fosfato al residuo de aspartato 53 (D53) de PiIR. La forma no fosforilada de PiIR se une a la región promotora de *pilA* activando su expresión, la cual está dirigida por RNAPol- σ^{54} . (Extraída de Hernández-Eligio y col., 2016a).

Integration Host Factor (IHF)

Las proteínas tipo EBP estimulan la expresión genética a distancia debido a su unión a secuencias en el DNA conocidas como ELE (*Enhancer Like Element*, de ahí el nombre de enhancer binding protein) (Morett y Segovia, 1993), tal como se muestra en la Figura 8 y como se vio para el caso de PiIR (Figura 6). Se trata de secuencias de nucleótidos palindrómicas, o casi palindrómicas, encontradas normalmente entre 100 y 200 pares de bases río arriba de ciertos tipos de promotores, y al igual que las secuencias *enhancer* eucariotas, son capaces de activar la expresión génica a cientos de pares de bases del sitio de inicio de transcripción. Se ha demostrado que las secuencias ELE son sitios de unión de proteínas reguladoras tipo EBP (Morett y Segovia, 1993).

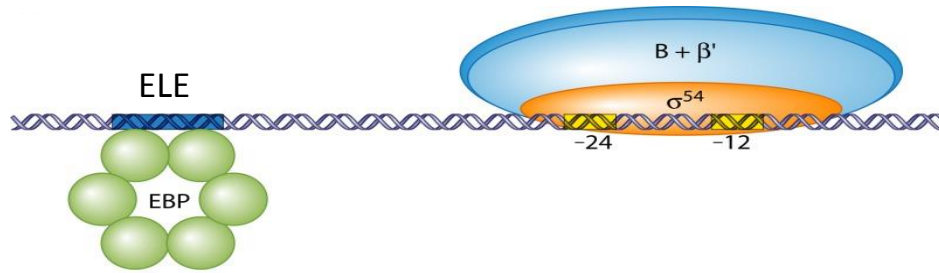


Figura 8. Unión de una EBP a un sitio ELE. Los sitios ELE llevan a cabo la activación de la expresión génica a distancia debido a la unión de proteínas tipo EBP, las cuales promueven la formación del complejo abierto en los procesos de transcripción dirigidos por RNAPol- σ^{54} . La EBP se muestra como un oligómero verde. (Modificada de Bush y Dixon, 2012).

Una EBP, como se ha mencionado, cataliza la hidrólisis del ATP y utiliza la energía obtenida para promover la formación del OC durante el inicio de la transcripción dependiente del factor sigma σ^{54} , un proceso que lleva a cabo estando unida a un sitio ELE. Muchos experimentos fueron diseñados para entender cómo las EBP podían activar la expresión génica a pesar de encontrarse lejos del sitio de inicio de transcripción, y se ha demostrado que la distancia y la posición del sitio ELE y el promotor es crítica para la activación (Morett y Segovia, 1993). En primera instancia, se propuso que las EBP podrían interactuar simultáneamente con las secuencias ELE y con la holoenzima $E\sigma^{54}$ unida al promotor, evento ocasionado por la formación de un bucle o *loop* en la estructura del DNA (Buck y col., 1986). Esta hipótesis fue posteriormente demostrada mediante observación directa utilizando microscopía electrónica (Su y col., 1990).

En una gran cantidad de casos, la formación del bucle que enlaza la EBP con la holoenzima $E\sigma^{54}$ es facilitada por una nucleoproteína denominada IHF (Integration Host Factor), un heterodímero que se une al DNA entre la secuencia ELE y el promotor, causando una flexión o plegamiento en el DNA (Cannon y col., 1990), como se muestra en las Figuras 9 y 10.

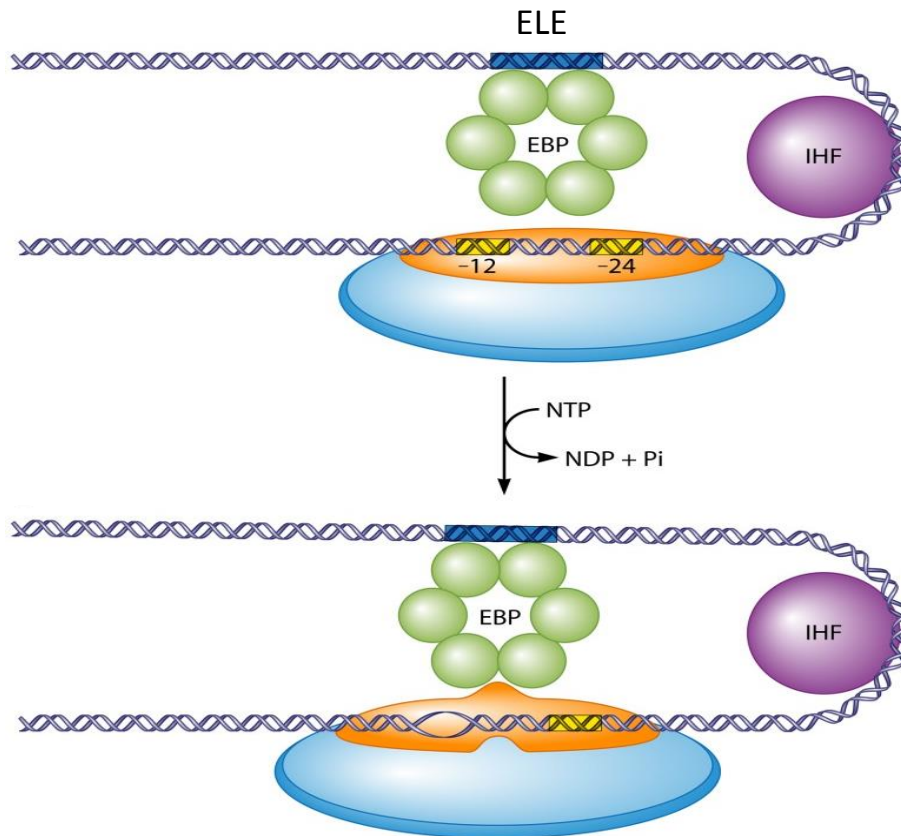


Figura 9. Activación de la transcripción bacteriana dependiente de σ^{54} . σ^{54} conduce a la RNA polimerasa uniéndose en las regiones -12/-24 del promotor. La interacción de la EBP bacteriana (mostrada como un oligómero verde) con σ^{54} -RNAPol es dependiente de su unión a secuencias ELE localizadas a decenas de pares de bases del sitio de inicio de transcripción. El bucle formado en la estructura del DNA es facilitado frecuentemente por la proteína IHF (Integration Host Factor), permitiendo la interacción EBP- σ^{54} . (Modificada de Bush y Dixon, 2012).

IHF (Figura 10) es una proteína heterodimérica tipo histona, multifuncional, de unión al DNA, estudiada por primera vez en *Escherichia coli*. Se trata de un complejo pequeño (21.8 kDa) compuesto por dos subunidades distintas (α y β) codificadas en *E. coli* por los genes *himA* y *himD*. IHF es considerado como una proteína “funcionalmente redundante”, debido a que participa en un gran número de procesos en este microorganismo, tales como replicación del DNA, recombinación sitio-específica y regulación de la expresión génica (Freundlich y col., 1992).

IHF es considerado como miembro de las proteínas tipo histona debido a su capacidad de compactar el DNA, además de que sus subunidades muestran una fuerte homología en

su secuencia de aminoácidos con las proteínas HU. En contraste con estas últimas, IHF se une al DNA fuertemente a secuencias específicas. Un único heterodímero de IHF se une a sitios de aproximadamente 35 pares de bases que contienen la secuencia consenso de 13 pb WATCAANNNTTR (Craig y Nash, 1984).

El interés en esta proteína multifuncional fue acelerado por dos grandes observaciones. La primera, como ya se mencionó, es que se demostró que IHF es necesario para la activación de la transcripción de algunos promotores dependientes de σ^{54} en bacterias Gram-negativas (Collado-Vides y col., 1991). Una segunda observación es el hecho de que una región del dominio de unión a DNA de IHF es similar a la del factor de transcripción eucariota TFIID (necesario para la síntesis de RNAm por la RNA polimerasa II), además de que ambas proteínas aparentemente se unen a DNA interactuando primeramente con el surco menor (Nash y Granston, 1991).

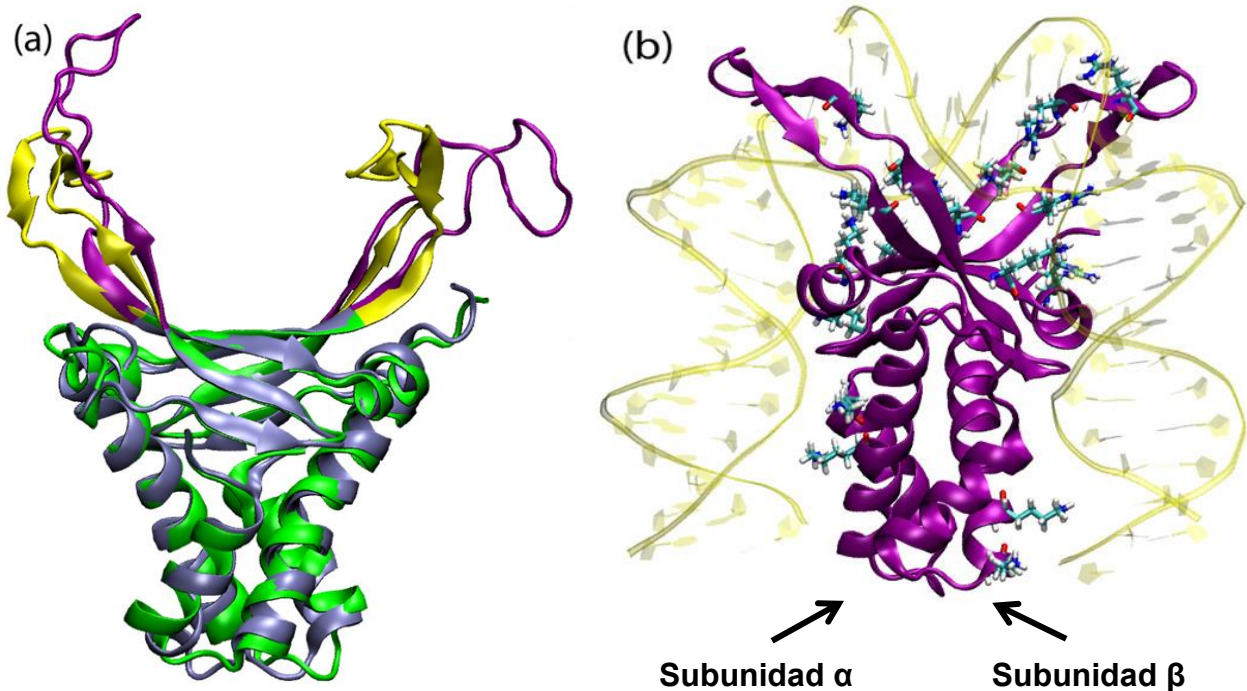


Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína heterodimérica IHF. A, estructura de IHF obtenida mediante dinámicas moleculares. B, estructura cristalográfica del complejo IHF-DNA. Se muestra la flexión o *loop* en el DNA causada por su interacción con IHF. IHF se muestra de color morado, mientras que el DNA se muestra de color amarillo. (Modificada de Ma y col., 2011).

Diversos estudios han demostrado el rol de IHF en la regulación de la expresión genética en diversas bacterias Gram negativas, como se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. IHF participa en la regulación de la expresión genética en bacterias Gram negativas.

Bacteria	Papel regulador de IHF en la expresión génica	Fuente
<i>Escherichia coli</i>	-Síntesis de valina e isoleucina -Síntesis de fimbrias tipo I -Síntesis de proteínas de membrana externa	(Freundlich y col., 1992)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-Genes de fijación de nitrógeno	(Hoover y col., 1990)
<i>Vibrio cholerae</i>	-Factores de virulencia: pili y toxina colérica	(Stonehouse y col., 2008)
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	-Proteínas envueltas en la formación del septo durante la división celular	(Fiévet y col., 2014)

En *G. sulfurreducens* se han encontrado genes homólogos que codifican para las subunidades α y β del complejo heterodimérico IHF (Figura 11). Sorpresivamente, estos genes se encuentran duplicados dentro del genoma de esta bacteria, es decir, existen dos genes que codifican para la subunidad α (denominados *ihfA-1* e *ihfA-2*) y dos que codifican para la subunidad β (*ihfB-1* e *ihfB-2*) (Methé y col., 2003). Los cuatro genes se transcriben en *G. sulfurreducens* (Hernández-Eligio, comunicación personal), pero realmente es poco lo que se conoce acerca de esta proteína en términos de la regulación de sus genes blanco.

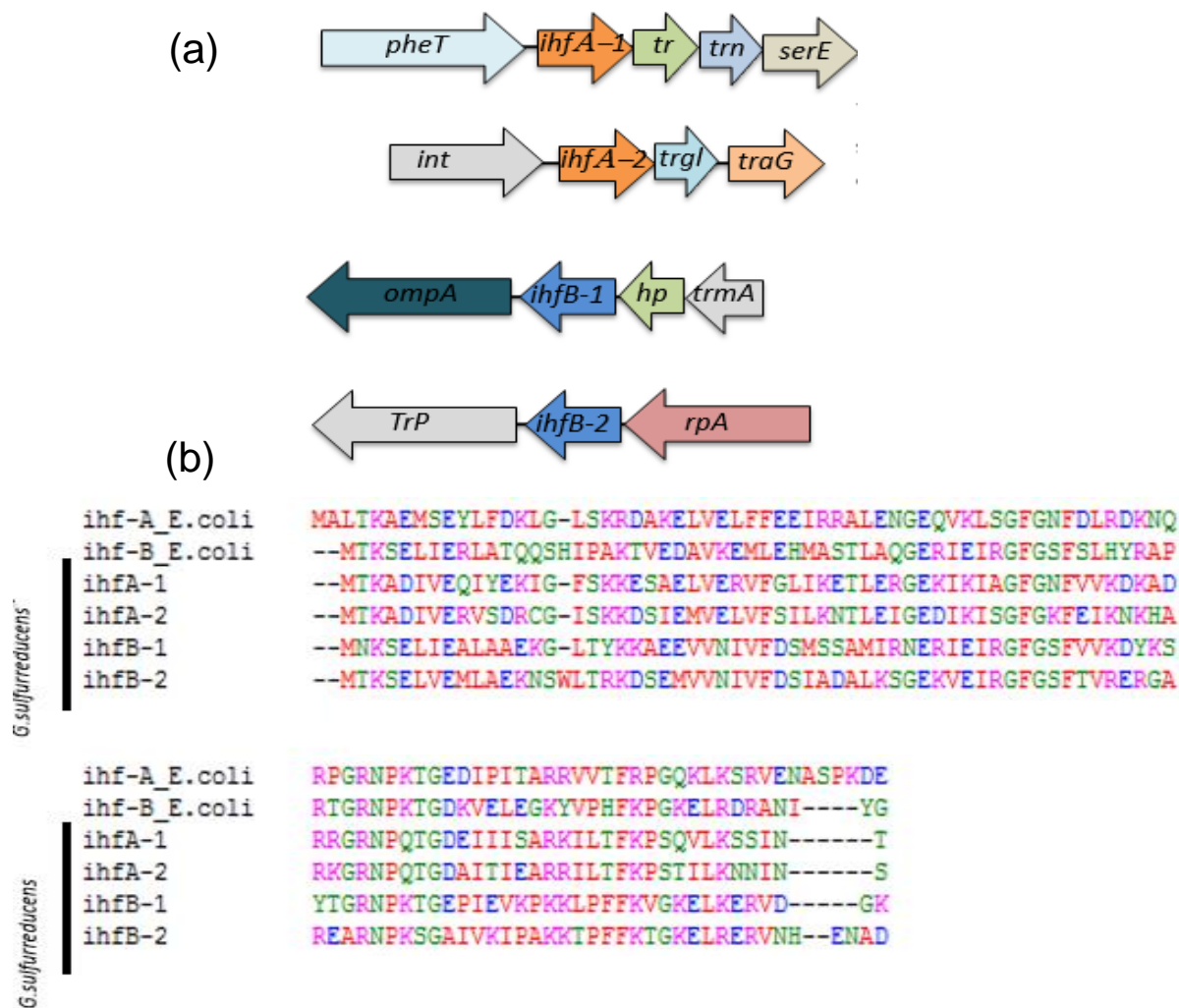


Figura 11. IHF es codificado por el genoma de *Geobacter sulfurreducens*. A, organización génica alrededor de los genes *ihf* en *G. sulfurreducens*. B, alineamiento de las subunidades del heterodímero IHF de *E. coli* y *G. sulfurreducens*. (Imagen otorgada por Hernández-Eligio).

Los cuatro genes *ihf* están localizados en diferentes regiones del genoma y sus proteínas presentan un alto grado de conservación. En *G. sulfurreducens*, *Ihfa1* e *Ihfa2* presentan 49% y 47% de identidad con *Ihfa* de *E. coli*, respectivamente; mientras que *Ihfb1* e *Ihfb2* por su parte presentan 47% y 48% de identidad con la subunidad *Ihfb* de *E. coli*, respectivamente (Hernández y col., 2016b).

Estudios recientes sugieren la participación del complejo IHF en la regulación transcripcional del gen *pilA*, actuando como un activador (Hernández-Eligio y col., 2016b). Mutaciones realizadas en los genes *ihfA-1*, *ihfB-1* e *ihfB-2* (Andrade y col., 2016) presentan un fenotipo de crecimiento disminuido en medios con acetato como donador de electrones y

fumarato como aceptor final, probablemente debido a que el complejo IHF participa en la regulación de la expresión de transportadores de fumarato o enzimas involucradas en su reducción. Así mismo, estas cepas presentan deficiencias en la reducción de Fe(III) soluble (debido probablemente a que IHF está controlando la transcripción de genes que codifican para citocromos tipo-*c* relevantes en la transferencia de electrones a este aceptor final) y óxidos de Fe(III), lo cual es atribuido principalmente a una drástica disminución de la expresión de la proteína estructural PilA, tal como demuestran los experimentos de inmunodetección y RTq-PCR (Hernández-Eligio y col., 2016b).

Lo anterior muestra que las proteínas del complejo IHF están controlando la expresión de *pilA*, sugiriendo que los fenotipos en cuanto a la reducción de Fe(III) a Fe(II) pueden deberse principalmente a la ausencia del pili y a otras proteínas relevantes en la transferencia extracelular de electrones (Hernández-Eligio y col., 2016b).

Por otro lado, estudios computacionales y experimentales demuestran la existencia de tres sitios de unión a IHF en la región intergénica *pilR-pilA*, tal como se muestra en la Figura 12. El primer sitio corresponde a la secuencia 5'-GTGTAACGTGCTG-3', y está localizado en las posiciones -70 a -85 del sitio de inicio de transcripción de *pilA*. El segundo sitio tiene la secuencia 5'-GTTGAAGCGGTTG-3' y está localizado en las posiciones -87 a -102, y el tercer sitio comprende la secuencia 5'-GACGAAATAGGTG-3', localizado en la posición -111 a -127. Los tres sitios se encuentran posicionados entre los sitios de unión de PilR y el promotor dependiente de σ^{54} . Estos datos sugieren que el complejo IHF regula de manera directa la transcripción de la proteína pilina, uniéndose de manera específica a la región promotora de *pilA* (Hernández-Eligio y col., 2016b).

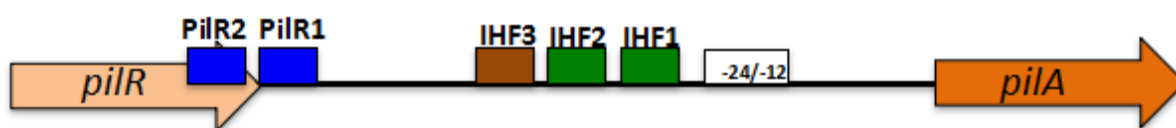


Figura 12. Representación esquemática de la región intergénica *pilR-pilA*. El recuadro blanco representa el promotor σ^{54} , los cuadros sobre la línea representan los sitios de unión a PilR (azul) y los sitios de unión a IHF (verde). (Modificada de Hernández-Eligio y col., 2016b).

Con base en lo anterior, se propone un modelo de regulación en donde el complejo IHF favorece la activación transcripcional del gen *pilA*. El regulador de respuesta PilR (EBP)

en su estado no fosforilado se une al DNA río arriba de la región promotora de *pilA* y activa a la RNA polimerasa dependiente de σ^{54} , proceso favorecido por la unión de IHF entre el promotor de *pilA* y los sitios de unión de PilR, formando un doblamiento agudo del DNA que promueve la interacción entre esta última y RNAPol- σ^{54} , tal como se muestra en la Figura 13 (Hernández-Eligio y col., 2016b).

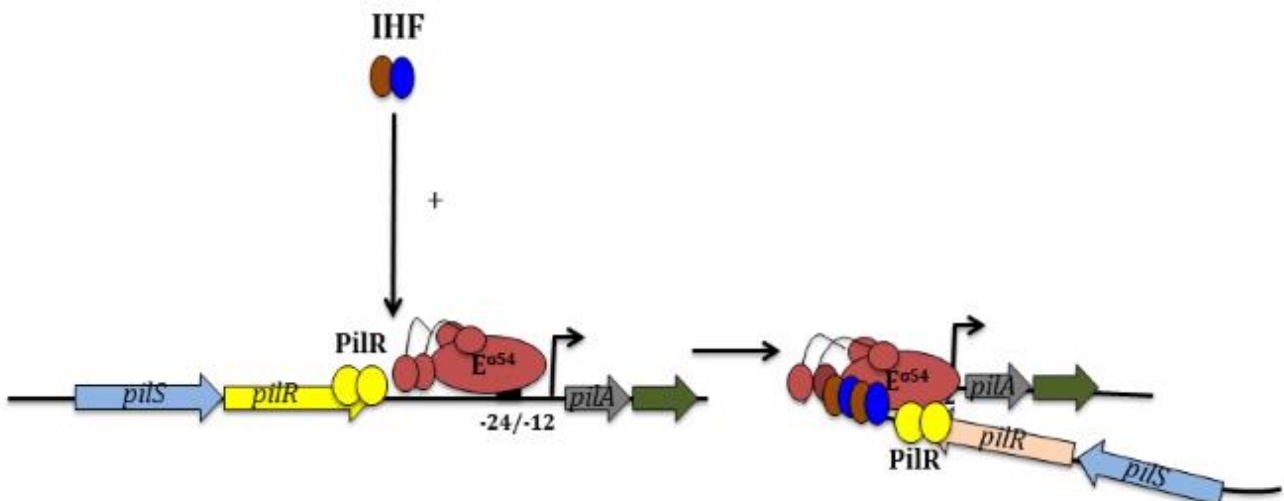


Figura 13. Modelo de regulación transcripcional del gen *pilA* en *Geobacter sulfurreducens*. La activación del inicio de transcripción está mediada por los reguladores PilR, σ^{54} e IHF.

Análisis previos del transcriptoma de *G. sulfurreducens* sugieren que la expresión del gen *ihfA-2* tiene un nivel de expresión mucho menor que los genes *ihfA-1*, *ihfB-1* e *ihfB-2* (Hernández-Eligio, comunicación personal). Sin embargo, debido a los fenotipos que presentan las mutantes, se propone que la cepa $\Delta ihfA-2$ presentará un fenotipo similar a sus semejantes, pudiendo con esto concluir finalmente el modelo de regulación del gen *pilA* involucrando al complejo IHF como una proteína de suma importancia en los procesos de transferencia de electrones.

HIPÓTESIS

Una vez construida, se espera que la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *Geobacter sulfurreducens* posea un fenotipo similar a las mutantes $\Delta ihfA-1$, $\Delta ihfB-1$ y $\Delta ihfB-2$, es decir, que presente un fenotipo alterado en la transferencia extracelular de electrones, reafirmando que los productos de los genes *ihf* están involucrados en la regulación de dicho proceso.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Estudiar el proceso de transferencia extracelular de electrones en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en *Geobacter sulfurreducens*.

Objetivos Específicos

- Construir una cepa mutante para el gen *ihfA-2* en *Geobacter sulfurreducens*.
- Caracterizar la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en cuanto a su capacidad de crecimiento en distintos medios de cultivo con diferentes donadores y aceptores de electrones.
- Analizar el efecto de la mutación $\Delta ihfA-2$ sobre la expresión de genes relacionados con la transferencia de electrones, como *pilA* y algunos responsables de la síntesis de citocromos tipo-c.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Construcción de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$ de *Geobacter sulfurreducens*

Con base en la secuencia del gen *ihfA-2* de la cepa DL-1 de *G. sulfurreducens* (www.genome.jp/kegg), se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR este gen flanqueado por sus regiones intergénicas (Figuras 14 y 15a). El producto de PCR se clonó en el plásmido pJET1.2/blunt; a este plásmido se le denominó pGEN (Figura 15b). Utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV*, se llevó a cabo una doble digestión sobre el gen *ihfA-2* (Figura 15b), con el fin de deletar un fragmento de este gen. Los extremos libres cohesivos generados fueron reparados con una exonucleasa y religados posteriormente con una ligasa de DNA. Al plásmido obtenido se le denominó pGENR (Figura 15c).

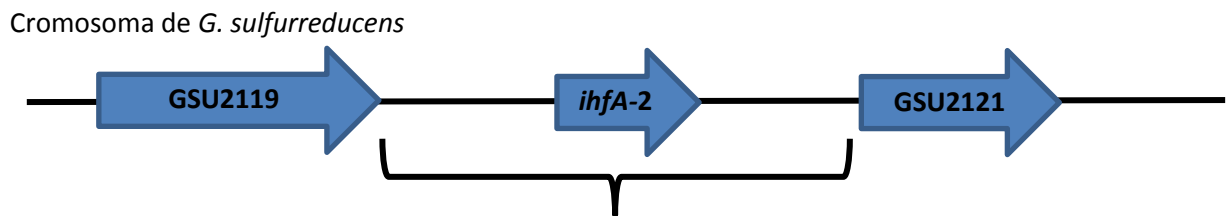


Figura 14. Región amplificada por PCR.

Posteriormente, se amplificó por PCR el gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas a partir del plásmido pGENR, generándole un sitio para el corte de la enzima *EcoRI* a cada extremo de las regiones intergénicas (Figura 15d). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pK18mobsacB (previamente digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*); al plásmido obtenido se le denominó pHAM (Figura 15e).

Habiendo insertado el gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas, se llevó a cabo la cointegración del plásmido en el genoma de *G. sulfurreducens* mediante recombinación homóloga sencilla, seleccionando con kanamicina (Figura 15f). Posteriormente, se llevó a cabo la contraselección con sacarosa, buscando aquellas células donde el gen mutante se intercambió por el gen silvestre. La mutación se comprobó mediante PCR (Figura 15g, h).

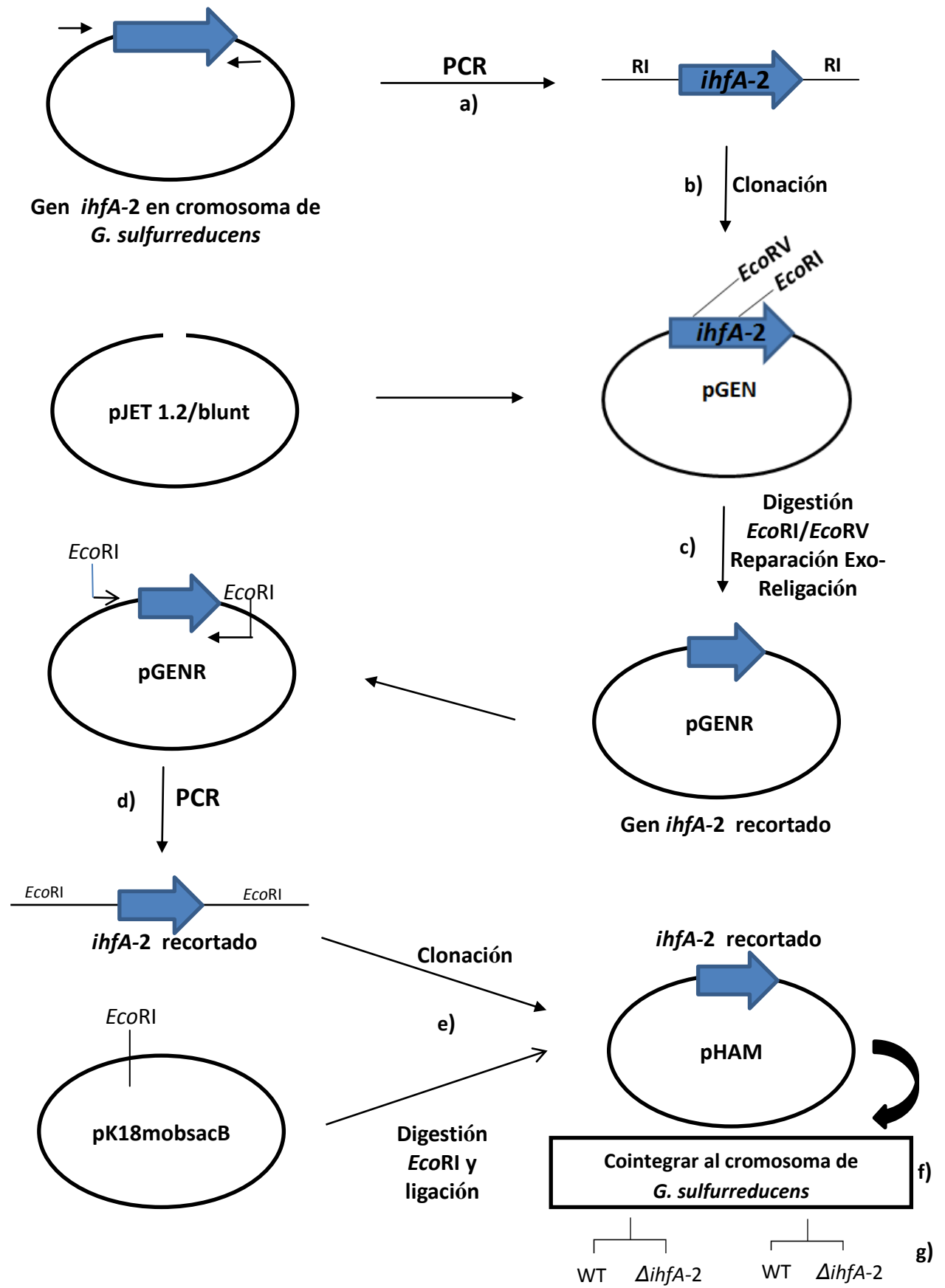


Figura 15. Estrategia para construir la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en *G. sulfurreducens*. Ver el texto para más detalles.

Caracterización de la Cepa Mutante *ΔihfA-2* de *Geobacter sulfurreducens*

La caracterización de la cepa mutante *ΔihfA-2* de *Geobacter sulfurreducens* se llevó a cabo como se muestra en la Figura 16. En una primera etapa, se sembraron en condiciones anaerobias las cepas WT y *ΔihfA-2* de *Geobacter sulfurreducens* en tubos de 10 mL de medio NBAF y se incubaron durante 48 horas a 30°C. Posteriormente, a partir de estos cultivos, se tomaron volúmenes celulares iguales de ambas cepas para ser resembrados en nuevos tubos con medio NBAF, así como también en medios de citrato férrico, esto con el fin de desarrollar cinéticas de crecimiento y reducción de Fe(III). La curva de crecimiento en medio NBAF se comenzó a una DO_{600nm} de 0.05. Los medios de cultivo inoculados fueron incubados a 30°C durante 96 horas, tiempo durante el cual se desarrollaron ambas cinéticas.

En una segunda etapa, para obtener un mayor volumen de cultivo celular, se resembraron ambas cepas en botellas de 100 mL de medio NBAF y se incubaron durante 48 horas a 30°C. Una vez obtenido crecimiento, se formaron las pastillas celulares centrifugando los medios de cultivo a 4000 r.p.m. durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Las pastillas celulares obtenidas fueron almacenadas en tubos eppendorf a una temperatura de -70°C para su posterior utilización en experimentos de inmunodetección tipo “Western blot” y purificación fraccionada de proteínas.

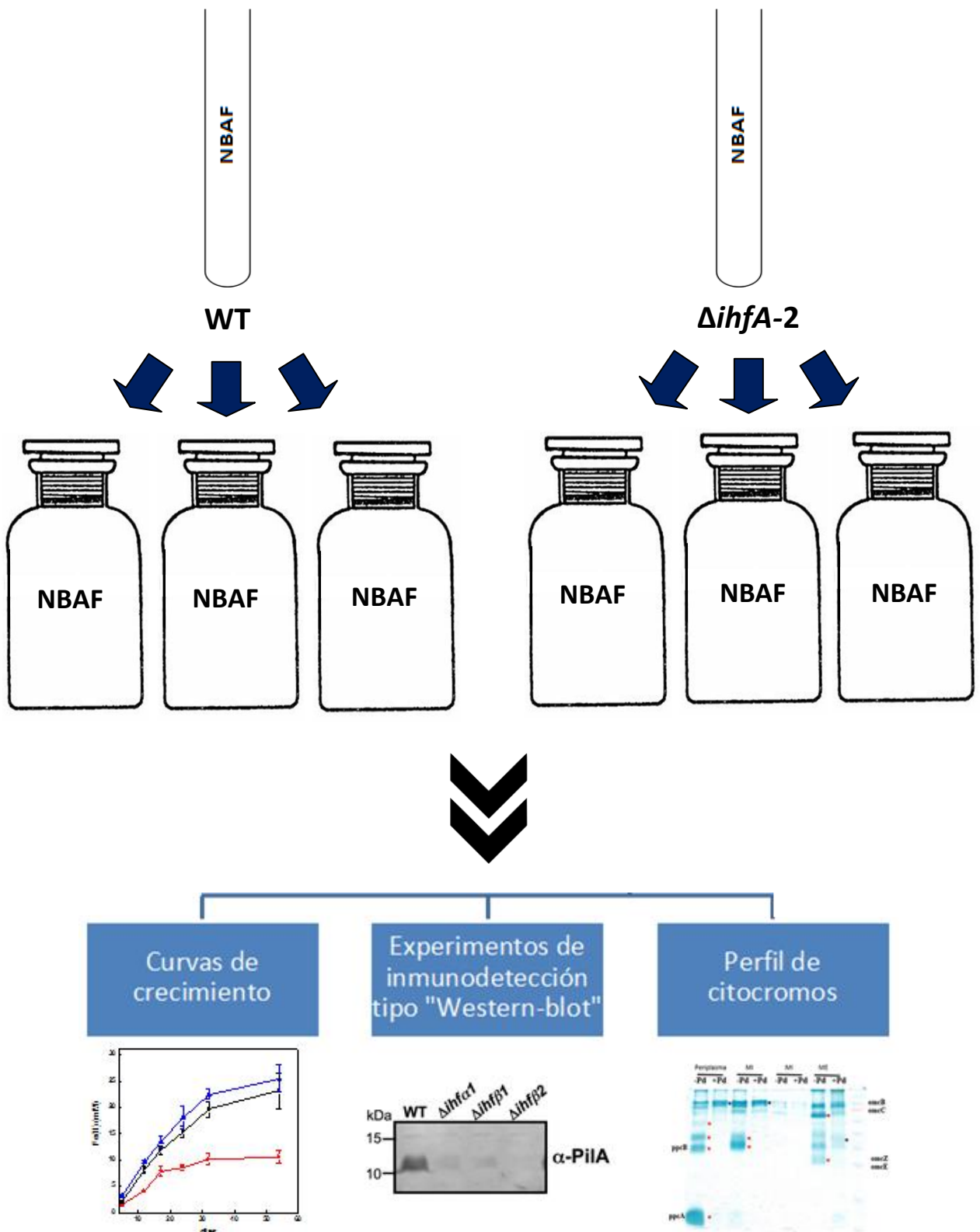


Figura 16. Estrategia para caracterizar la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens*. Ver el texto para más detalles.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue llevada a cabo en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis dentro de las instalaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM), en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.

A continuación, se presenta una lista de materiales y métodos experimentales que se utilizaron durante el desarrollo del proyecto.

Las cepas de *Geobacter sulfurreducens* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 3. Los plásmidos utilizados se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 3. Cepas utilizadas en esta investigación.

Cepa	Fenotipo/Genotipo	Referencia
<i>Geobacter sulfurreducens</i>		
DL-1	Cepa silvestre	(Coppi y col., 2001)
$\Delta ihfA-2$	Derivada de DL-1 (delección del gen <i>ihfA-2</i>)	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i>	(Kawashima y col., 1984)
XL1-Blue pGEN	Derivada de XL1-Blue (plásmido pGEN)	Este trabajo
XL1-Blue pGENR	Derivada de XL1-Blue (plásmido pGENR)	Este trabajo
XL1-Blue pHAM	Derivada de XL1-Blue (plásmido pHAM)	Este trabajo
S17-1	<i>TpR SmR recA thi pro hsdRP4</i>	(Simon y col., 1983)
S17-1 pHAM	Derivada de S17-1 (plásmido pHAM)	Este trabajo

Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta investigación.

Plásmido	Característica	Referencia
pJET1.2/blunt	Vector de clonación (2974 pb) Amp ^R	Thermofisher
pK18mobsacB	Vector de clonación (5721 pb) Plásmido suicida <i>sacB</i> . Kan ^R	(Chan y col., 2015)
pGEN	pJET1.2/blunt, con el gen <i>ihfA-2</i> flanqueado por sus regiones intergénicas	Este trabajo
pGENR	Derivado de pGEN. El gen <i>ihfA-2</i> sufrió una delección utilizando las enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>EcoRV</i>	Este trabajo
pHAM	pK18mobsacB con el gen <i>ihfA-2</i> deletado	Este trabajo

Medios y Condiciones de Cultivo de las Cepas de *G. sulfurreducens* y *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (con la siguiente composición en g/L: peptona de caseína 10, cloruro de sodio 10, extracto de levadura 5 para medio líquido y suplementado con 15 gramos de agar para medio sólido), y se incubaron a 37°C por 8-12 horas. Por su parte, las cepas de *G. sulfurreducens* se crecieron a 30°C por 2-7 días en medio NBAF (el cual contiene en un litro: 40 mL de fumarato de sodio 1 M, 10 mL de NB sales, 10 mL de mineral elixir, 15 mL de DL vitaminas, 10 mL de CaCl₂ 0.4%, 10 mL de MgSO₄ · 7H₂O 1%, 1 mL de Na₂SeO₄ 1mM, 0.5 mL de resazurina, 1.8 g de NaHCO₃, 0.5 g de Na₂CO₃ · H₂O, 1.23 g de acetato de sodio para medio líquido y suplementado con agar al 2.5% para medio sólido. Para establecer condiciones anaeróbicas, el medio fue burbujeado con una mezcla 80:20 de N₂/CO₂ para desplazar el oxígeno disuelto. Antes de la inoculación se agregó L-cisteína 100 mM como agente reductor a razón de 1mL por cada 100 mL de medio, y extracto de levadura al 5% como fuente de nitrógeno a razón de 1 mL por cada 100 mL de medio. Para la inoculación de *G. sulfurreducens* se utilizaron jeringas purgadas con la mezcla de gases previamente descrita). Para los ensayos de reducción de Fe(III), se creció en condiciones anaeróbicas a *G. sulfurreducens* en medio acetato-citrato férrico (el cual contiene en un litro: 13.7 g de citrato férrico, 2.5 g de NaHCO₃, 0.25 g de NH₄Cl, 0.06 g de NaH₂PO₄ · H₂O, 0.1 g de KCl, 500 mL de NaOH 0.15 N, 10 mL de DL vitaminas, 10 mL de DL minerales y 1 mL de Na₂SeO₄ 1 mM. El pH del medio se ajustó a 7. Antes de la inoculación se agregó acetato de sodio 2 M a razón de 100 µL por cada 10 mL de medio). Los antibióticos utilizados para *E. coli* fueron: ampicilina 200 µg/mL y kanamicina 30 µg/mL en medio líquido o sólido. Para *G. sulfurreducens* fue kanamicina 200 µg/mL en medio líquido o sólido.

Extracción de ADN Cromosomal de *G. sulfurreducens* DL-1 y Δ ihfA-2

La extracción de ADN cromosomal de *G. sulfurreducens* fue realizada siguiendo el protocolo de Epicentre MasterPure™ DNA Purification Kit. *G. sulfurreducens* se creció en 10 mL de medio NBAF líquido a 30°C durante 48 horas. Se centrifugaron los 10 mL de cultivo a 4500 r.p.m. 10 minutos para obtener la pastilla celular, la cual se transfirió a un tubo de 1.5 mL tipo eppendorf. Se agregaron 300 µL de solución de lisis de células y tejidos, la cual contiene Proteinasa K (1 µL de proteinasa en 300 µL de la solución). Se incubó el paquete celular a 65°C durante 15 minutos, agitándolo cada cinco min. Se dejó enfriar la mezcla hasta los 37°C y se agregó 1µL de RNasa A (5 µg/µL). Se dejó reposar la muestra a 37°C

por 30 min. Pasado este tiempo, se incubó por cinco minutos en hielo. Se adicionaron 175 μ L de reactivo de precipitación de proteínas MPC y se agitó vigorosamente la mezcla durante 10 segundos. Se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Se agregaron 500 μ L de isopropanol al sobrenadante recuperado. Se invirtió el tubo 30-40 veces (hasta la aparición de “hilos” blancos que corresponden al ADN). Se formó la pastilla de ADN centrifugando a 14,000 r.p.m. 10 min y se eliminó cuidadosamente el exceso de isopropanol. La pastilla se lavó dos veces con 500 μ L de etanol al 70%. Cuidadosamente se retiró el etanol y la pastilla se dejó secar a 37°C por 10 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 35 μ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM [pH 7.5], EDTA 1 mM).

Amplificación por PCR del Gen *ihfA-2* Flanqueado por sus Regiones Intergénicas

El gen *ihfA-2* de *G. sulfurreducens* se amplificó con sus regiones intergénicas mediante PCR usando como templado ADN cromosomal de la cepa DL-1 y los oligonucleótidos: IHFA2Fw (5'- TTCCATCGTGCATTTGCTT -3') e IHFA2rev (5'- GATTCCCCCTACGACTATAA -3'). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización 95°C/3 min, temperatura de alineamiento 60°C/0.75 min, temperatura de extensión 72°C/0.5 min, 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo adicional de extensión a 72°C/5 min.

Amplificación por PCR del Gen *ihfA-2*^{deletado} Flanqueado por sus Regiones Intergénicas a Partir del Plásmido pGENR

Se amplificó el gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas mediante PCR, utilizando como templado el plásmido pGENR y los oligonucleótidos: IHFA2EcoFw (5'- ATGAATTCTTCCATCGTGCATTTGCTT-3') e IHFA2Ecorev (5'- ATGAATTGATTCCCCCTACGACTATAA- 3'). Los oligonucleótidos IHFA2EcoFw e IHFA2Ecorev están diseñados para generar un sitio *EcoRI* a cada lado del producto de PCR y así ligarlo en el plásmido pK18mobsacB (previamente digerido con *EcoRI*). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización 95°C/3 min, temperatura de alineamiento 60°C/0.75 min, temperatura de extensión 72°C/0.5 min, 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo adicional de extensión a 72°C/5 min.

Reacciones de Digestión de ADN

Digestión Para Analizar por Electroforesis el Patrón de Restricción

Las digestiones que se realizaron para los plásmidos pGEN, pGENR y pK18mobsacB se llevaron a cabo de la siguiente manera: ADN plasmídico 2.5 µL, enzima (*Bgl*II, *Eco*RI) 0.5 µL, buffer (10x) 1 µL, H₂O 6 µL, el volumen final fue de 10 µL. Finalmente, la reacción se incubó por una hora a 37°C.

Digestión Para Purificar el Vector por Electroforesis

Las digestiones que se realizaron para los plásmidos pGEN y pK18mobsacB se llevaron a cabo de la siguiente manera: ADN plasmídico 50 µL, enzima (*Eco*RI) 2 µL, buffer (10x) 6 µL, H₂O 2 µL, el volumen final fue de 60 µL. La reacción se incubó por una hora a 37°C.

Digestión Para Deletar un Fragmento del Gen *ihfA-2*

La digestión que se realizó sobre el gen *ihfA-2* contenido en el plásmido pGEN fue llevada a cabo en dos pasos. Primeramente se realizó una restricción con *Eco*RI, linealizando el plásmido, de la siguiente manera: ADN plasmídico 50 µL, enzima (*Eco*RI) 2 µL, buffer (10x) 6 µL, H₂O 2 µL, el volumen final fue de 60 µL; la reacción se incubó por una hora a 37°C. El vector linealizado se purificó a partir de una electroforesis. En segunda instancia, se llevó a cabo una restricción con *Eco*RV, de la siguiente manera: ADN plasmídico 20 µL, enzima (*Eco*RV) 1 µL, buffer (10x) 3 µL, H₂O 6 µL, el volumen final fue de 30 µL; la reacción se incubó por una hora a 37°C. Los extremos cohesivos fueron reparados posteriormente utilizando la exonucleasa *Blunting enzyme*.

Reacciones de Reparación-Ligación

Con el fin de reparar los extremos cohesivos generados por la enzima de restricción *Eco*RI al momento de la delección sobre el gen *ihfA-2* se utilizó la exonucleasa de cadena sencilla *Blunting enzyme* del Thermo-scientific CloneJET PCR Cloning Kit, esto para eliminar dichos extremos cohesivos y proceder posteriormente a una ligación con extremos rasurados para finalizar la construcción del plásmido pGENR. Las reacciones de reparación se llevaron a cabo de la siguiente manera: ADN plasmídico 7 µL, buffer (2x) 10 µL, enzima (*blunting enzyme*) 1 µL, H₂O 1 µL, el volumen final fue de 19 µL; la reacción se incubó a 70°C durante

cinco minutos y posteriormente fue colocada en hielo. Para ligar los extremos rasurados generados, se agregó a la reacción 1 μL de T4 ADN ligasa y se incubó a 22°C durante 30 minutos, generando de esta forma el plásmido pGENR.

Electroforesis de ADN

Se prepararon geles de agarosa al 1% en una solución amortiguadora TBE 1X (buffer Tris-Boratos 10X: 890mM Tris, 890mM ácido bórico, 20mM EDTA.). Los geles fueron preteñidos con bromuro de etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los pozos del gel fueron cargados de acuerdo a la concentración necesaria de la muestra de interés, más 1-2 μL de buffer de carga (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.02% y xilencianol 0.02%). Como marcador de peso molecular se utilizó Thermo-scientific GeneRuler DNA Ladder Mix, que fue utilizado para calcular el tamaño de las bandas de ADN y su concentración. La electroforesis se corrió a 80 volts, por 45-60 minutos en una solución amortiguadora TBE al 1x. Finalmente, se observó el gel en el transiluminador de luz UV para visualizar el ADN.

Purificación de los Vectores y Productos de PCR por Electroforesis

Para purificar banda a partir de una electroforesis en gel de agarosa se utilizó el QIAGEN QIAEXII Gel Extraction Kit. Se corrió suficiente ADN en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones de corrida fueron de 80 volts por 46-60 minutos. Utilizando el transiluminador, se cortó la banda deseada y se transfirió a un tubo eppendorf (previamente pesado). Se agregaron tres volúmenes de buffer QXI (buffer de solubilización con NaClO_4 , sin más indicaciones del fabricante). Posteriormente se agregaron 10 μL de resina –suspensión de sílica- (previamente resuspendida en vórtex). La mezcla se incubó a 50°C durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. durante un minuto. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de buffer QXI. Se centrifugó la mezcla a 14,000 r.p.m. durante un minuto y se eliminó el sobrenadante nuevamente. La mezcla se lavó dos veces con buffer PE-etanol (buffer de lavado: Tris-HCl 10 mM [pH 7.5], etanol al 80%) y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante un minuto. Se descartó el sobrenadante y se eliminaron todos los residuos cuidadosamente, conservando solamente la resina, la cual se dejó secar. Se agregaron a la resina 30 μL de agua y se resuspendió la mezcla, la cual se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. durante dos minutos, removiendo la fase acuosa en donde se encontraba el ADN y se transfirió a un tubo limpio.

Reacciones de Ligación

Una vez que se obtuvo el fragmento de ADN deseado, este se ligó a un vector previamente digerido con una enzima de restricción en una relación molar 3 (inserto): 1 (vector). Se utilizó la enzima T4 ADN ligasa siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Scientific^{M.R.}). Se agregó agua a la reacción hasta un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de ligación fueron las siguientes: se incubó la reacción a 22°C durante una hora. Posteriormente se procedió a realizar transformación en *E. coli* XL1-Blue/ *E. coli* S17-1.

Preparación de Células Competentes de *E. coli* XL1-Blue y *E. coli* S17-1 por el Método de CaCl₂

Se transfirió una colonia bacteriana (*E. coli* XL1-Blue/S17-1) a 5 mL de LB y se creció a 37°C durante 8-12 horas. Posteriormente, se inocularon 100 mL de LB (en matraz de 250 mL) con 1 mL de este cultivo y se incubó a 37°C durante 3-4 horas en agitación (hasta alcanzar una D.O_{600 nm} de 0.8). Una vez pasado este tiempo, se colocó el cultivo en hielo durante 20 minutos, para detener el crecimiento bacteriano. Se recuperó el cultivo en botellas de polipropileno y la muestra se centrifugó a 4,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C (utilizando una ultracentrífuga con temperatura). Una vez obtenido el paquete celular, este se resuspendió en 30 mL de CaCl₂ 100 mM frío y se incubó en hielo durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 4,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 2-3 mL de una mezcla de CaCl₂ 100 mM y glicerol al 14%. Se hicieron alícuotas de 0.2 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL y se mantuvieron a -70°C hasta el momento de usarlas.

Transformación en *E.coli* XL1-Blue y *E. coli* S17-1

Se mezclaron 3-10 μ L de ADN con 100 μ L de células competentes de *E. coli*. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos y, posteriormente, se le dio un choque térmico a 42°C durante dos minutos. Pasado este tiempo, se colocó en hielo durante otros dos minutos. A la muestra se le adicionaron 500 μ L de LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante una hora con agitación constante. Después, se sembraron 150-200 μ L en cajas con medio LB sólido y el antibiótico correspondiente. Las cajas se incubaron a 37°C durante 8-12 horas.

Extracción de ADN Plasmídico

Para la extracción de plásmido se utilizó el Roche High Pure Plasmid Isolation Kit. Se realizó un inóculo con las células transformadas de *E. coli* en 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se vertió el cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante un minuto, obteniendo de esta forma la pastilla celular. Esta se resuspendió en 250 µL de la solución 1 adicionada con ARNasa (buffer de suspensión: Tris-HCl 50 mM [pH 8.0], EDTA 10 mM). Posteriormente, se agregaron 250 µL de buffer de lisis (solución 2, NaOH 0.2 M y SDS al 1 %), mezclando el contenido por inversión. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 350 µL de la solución 3 (buffer de unión: cloruro de guanidinio 4 M y acetato de potasio 0.5 M [pH 4.2]) y se incubó la mezcla en hielo durante 5 minutos, hasta la formación de una pasta algodonosa. La muestra se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo colector limpio (el cual posee una columna de afinidad de fibra de vidrio a donde se une el ADN plasmídico; está incluido en el kit). Se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. durante un minuto y se descartó el líquido de desecho. Se lavó la columna con 700 µL de buffer de lavado (solución 5: NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM [pH 7.5]) y se centrifugó la mezcla a 14,000 r.p.m. durante un minuto. Se descartó el líquido de desecho y se centrifugó la muestra durante un minuto adicional. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio y se agregaron 30 µL de agua. Finalmente, se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. durante un minuto, obteniéndose la fase acuosa en donde se encontraba el ADN.

Conjugación y Cointegración del Vector pHAM en el Cromosoma de *G. sulfurreducens* DL-1

Se realizó un inóculo de *G. sulfurreducens* DL-1 en 10 mL de medio NBAF en condiciones anaerobias y se incubó a 30°C hasta alcanzar una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.4 (aproximadamente 2 días). En ese lapso, por su parte, se realizó un inóculo de *E. coli* S17-1 con el vector suicida pK18mobsacB con el fragmento a mutar (es decir, con el plásmido pHAM) en 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se tomó 1 mL de cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó a 5,000 g durante dos minutos, obteniendo de esta forma el paquete celular. Dentro de una cámara anaerobia, se tomó 1 mL del cultivo de *G. sulfurreducens* DL-1 y se le adicionó al tubo con la pastilla de células de *E. coli*; se centrifugó la mezcla a 2,000 g durante tres minutos y el sobrenadante fue descartado. La pastilla celular resultante fue resuspendida en 40 µL del sobrenadante

residual, la cual se colocó sobre papel filtro estéril poroso de 0.22 μm . Posteriormente, el papel filtro fue dispuesto sobre una caja con medio NBAF sólido durante cuatro horas en una atmósfera anaerobia, periodo durante el cual se dio el proceso de conjugación bacteriana. Pasado este tiempo, se levantó el filtro y se resuspendieron las células en NBAF líquido dentro de un tubo eppendorf. Después, se sembraron 200 μL en cajas con medio NBAF sólido y el antibiótico correspondiente (kanamicina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se incubaron a 30°C durante 1-4 semanas (hasta el crecimiento de colonias), permitiendo la cointegración del vector pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens* mediante recombinación homóloga.

Delección del Gen *ihfA-2* Mediante Contraselección con Sacarosa/*sacB*

El vector de delección fue conjugado en *G. sulfurreducens* utilizando la cepa donadora *E. coli* S17-1. Se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina y la integración del plásmido pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens* se confirmó mediante una PCR utilizando los oligonucleótidos IHFA2Fw e IHFA2rev. Las colonias resistentes a kanamicina se inocularon posteriormente en medio NBAF sólido con sacarosa al 10% y se incubaron a 30°C durante 2-7 días, permitiendo un segundo proceso de recombinación. Se seleccionaron las colonias resistentes a sacarosa y se inocularon en medio NBAF-kanamicina a 30°C durante 2-7 días. Se seleccionaron las colonias sensibles al antibiótico y la delección se confirmó mediante una PCR utilizando los oligonucleótidos IHFA2Fw e IHFA2rev.

Cinética de Crecimiento en Medio NBAF

Las cepas silvestre e $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* fueron crecidas en medio NBAF a 30° C. Para cuantificar el crecimiento de cada una de las cepas, se tomaron en condiciones anaeróbicas 700 μL de muestra de cultivo a las 0, 9, 24, 33, 48, 57, 72, 81 y 96 horas posteriores a la inoculación. Por último, se leyó la absorbancia de las muestras a 600 nm.

Cinética de la Reducción de Fe(III) Soluble/Cuantificación de Fe(II)

Las cepas silvestre e $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* fueron crecidas en medio acetato-citrato férrico a 30° C. Para cuantificar la reducción de Fe(III) a Fe(II) se implementó la técnica espectrofotométrica "Ferrozina". Se tomaron en condiciones anaeróbicas 100 μL de muestra

de cultivo a las 0, 9, 24, 33, 48, 57, 72, 81 y 96 horas posteriores a la inoculación y se adicionaron a 900 μL de HCl 0.5 N. De la mezcla anterior, se tomaron 50 μL y se adicionaron a 2,450 μL de ferrozina (Ferrozina 2 mM, HEPES 50 mM). Por último, se leyó la absorbancia de las muestras a 562 nm. Paralelamente se corrió una curva estándar de Fe(II) con las siguientes concentraciones: 0 μM , 0.4 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM y 16 μM (ver apéndice).

Extracción y Cuantificación de Proteína Total

Para la extracción de proteína total se crecieron las cepas silvestre y $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* en medio NBAF a 30° C durante 36 horas (comienzo de la fase estacionaria/término de la fase exponencial). Una vez crecidas, se procedió a obtener la pastilla celular, centrifugando los cultivos a 4,000 r. p. m. durante 20 minutos. La pastilla fue resuspendida en 200 μL de B-PER® (Thermo Scientific Bacterial Protein Extraction Reagent) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 14,000 r. p. m. durante 10 minutos. El sobrenadante se trasladó a un tubo eppendorf limpio. Para la cuantificación de proteína total se utilizó el equipo NanoDrop™ (Thermo Scientific NanoDrop 2000c Microvolume Spectrophotometer), midiendo un volumen de 2 μL de la muestra de interés. La concentración de proteína dada por este equipo se expresa en mg/mL.

Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

Para llevar a cabo electroforesis de proteínas, se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 15% (ver apéndice). Los pozos de los geles fueron cargados de acuerdo a la concentración necesaria de la muestra de interés, más un volumen de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM [pH 6.8], ditiotretitol 100 mM, SDS al 2 %, azul de bromofenol al 0.1 %, glicerol al 10 %). Como marcador de peso molecular se utilizó Thermo-scientific PageRuler Prestained Protein Ladder, que fue utilizado para calcular el tamaño de las bandas de proteína y su concentración. La electroforesis se corrió a 100 V por una hora y media en una solución amortiguadora Tris-Glicina 1X (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS al 0.1 %). Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (0.25 g de Coomassie Brilliant Blue en 90 mL de metanol:H₂O [1:1 v/v] y 10 mL de ácido acético glacial) durante 1 hora. Enseguida se lavaron con una solución desteñidora (90 mL de metanol:H₂O [1:1 v/v] y 10 mL de ácido acético glacial) por 30 minutos. Por último, los geles fueron secados para su preservación.

Experimentos de Inmunodetección Tipo “Western Blot”

Para los experimentos tipo “Western blot” se llevó a cabo la extracción de proteína total de las cepas WT e $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* crecidas en medio NBAF al comienzo de la fase estacionaria/término de la fase exponencial. Las proteínas totales fueron separadas en una electroforesis SDS-PAGE al 15%. Después de la separación, el gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de electrotransferencia (Biorad). El proceso de transferencia e inmunodetección se describe como sigue. Dentro de la cámara de transferencia fueron colocadas dos piezas de papel filtro (Whatman 3 mm), las cuales fueron humedecidas con buffer ánodo (Tris 25 mM, metanol al 20 %). La membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida fueron colocados justo por encima del papel filtro. Posteriormente, se colocaron otras dos piezas de papel filtro sobre el gel de poliacrilamida y el sistema fue humedecido con buffer cátodo (Tris 25 mM, glicina 40 mM, metanol al 20 %). Las condiciones de la electrotransferencia fueron 40 V y 200 mA, durante aproximadamente una hora y media. Pasado este tiempo se retiró la membrana y se sumergió en una solución buffer de fosfato salino PBS 1X (que contiene, para un litro: 1.44 g de Na_2HPO_4 , 0.22 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de KCl, 8 g NaCl) durante 15 minutos. Posteriormente, se trasladó la membrana a una solución bloqueadora (albúmina sérica bovina “BSA” al 3% en PBS 1X) y se dejó incubar durante toda la noche en un cuarto frío. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces (con una duración de cinco minutos cada lavado) con una solución de PBS 1X-Tween 0.3 %, y tres lavados más de la misma duración se realizaron con PBS 1X. A continuación se agregó a la membrana el anticuerpo primario (anti-PilA) a una dilución 1:1000, el cual fue preparado en una solución PBS-BSA 0.3 %; la membrana se incubó durante cuatro horas a temperatura ambiente en esta solución. Terminado el tiempo de incubación se repitieron los lavados con PBS 1X-Tween 0.3% (tres lavados) y PBS 1X (tres lavados), con duración de cinco minutos cada uno. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario (anti-IgG_{conejo} acoplado a fosfatasa) a una dilución 1:2000, el cual fue preparado en una solución PBS-BSA 0.3 %; la membrana se incubó por tres horas a temperatura ambiente en esta solución. Terminado el tiempo de incubación, la membrana se lavó tres veces con PBS 1X-Tween 0.3 % y tres veces con PBS 1X, con una duración de cinco minutos cada lavado. Finalmente, la proteína PilA fue revelada añadiendo a la membrana 1 mL del reactivo 1-Step™ BCIP-Nitro Blue Tetrazolium (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato) para permitir la reacción acoplada al segundo anticuerpo. Al aparecer la banda deseada, la reacción fue detenida agregando agua corriente.

Preparación de Fracciones de Membrana (Purificación Fraccionada de Proteínas)

Se crecieron las cepas silvestre y $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* en medio NBAF a 30° C durante 36 horas (comienzo de la fase estacionaria/término de la fase exponencial). Una vez crecidas, se procedió a obtener la pastilla celular, centrifugando los cultivos a 4,000 r. p. m. durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. La pastilla fue resuspendida suavemente en 15 mL de PBS 1X. La mezcla fue centrifugada a 8,000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, la pastilla obtenida fue resuspendida en 3 mL de Tris 50 mM [pH 7.4]. Las células resuspendidas fueron lisadas utilizando una prensa francesa, sometiénolas a una presión de 900 psi; el proceso fue repetido dos ocasiones más. El lisado obtenido fue centrifugado a 8,000 r.p.m. durante 14 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo, se tomó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 45,000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se etiquetó con el nombre de FRACCIÓN SOLUBLE/PERIPLASMA. La pastilla celular fue resuspendida en 2 mL de Tris 50 mM [pH 7.4], agregando a la mezcla lauril sarcosinato de sodio a 1% de concentración final. Se agregó una barra magnética a la muestra y se agitó en frío durante 30 minutos. La mezcla obtenida se ultracentrifugó a 45,000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se etiquetó con el nombre de MEMBRANA INTERNA 1. La pastilla celular fue resuspendida en 2 mL de Tris 50 mM [pH 7.4], agregando a la mezcla lauril sarcosinato de sodio a 1% de concentración final. Se agregó una barra magnética a la muestra y se agitó en frío durante 30 minutos. La mezcla obtenida se ultracentrifugó a 45,000 r.p.m. durante 45 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio y se etiquetó con el nombre de MEMBRANA INTERNA 2. La pastilla celular fue resuspendida en 200 μ L de Tris 50 mM [pH 7.4]-SDS 0.1 %. Esta última mezcla se trasladó a un tubo eppendorf limpio y se etiquetó con el nombre de MEMBRANA EXTERNA.

Concentración de Proteínas de Fracciones de Membrana

Con la finalidad de obtener muestras proteicas más concentradas, estas se hicieron pasar por una columna de afinidad Millipore Amicon® Ultra Centrifugal Filter Unit. La columna fue colocada dentro de un tubo eppendorf y se le agregaron 500 μ l de la muestra de interés. Dicha muestra fue posteriormente centrifugada a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Esta acción se repitió en varias ocasiones hasta concentrar la mayor cantidad de la muestra de interés. Finalmente, la columna fue colocada en posición invertida en un tubo eppendorf limpio y se centrifugó durante 2 minutos a 14,000 r.p.m. para

recuperar la muestra concentrada de proteínas. Para su cuantificación se utilizó el equipo NanoDrop™.

Tinción Hemo (Perfil de Citocromos)

Con el propósito de observar la expresión de citocromos tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante *ΔihfA-2* de *G. sulfurreducens*, se llevó a cabo un “Perfil de citocromos”, es decir, una tinción diferencial para estas metaloproteínas. Para lo anterior, se corrieron en una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15 %) 25 µg de la muestra de interés (en este caso, proteínas de membrana externa, membrana interna y periplasma obtenidas mediante purificación fraccionada). Posteriormente, el gel fue sumergido en una solución de tetrametilbencidina (TMB) con acetato de sodio (15 mL de TMB 6.3 mM en metanol; 35 mL de acetato de sodio 0.25 M [pH 5]) durante una hora en ausencia de luz. Pasado este tiempo (y aún en la oscuridad), se agregó a la solución H₂O₂ a una concentración final de 30 mM y se agitó durante 3-5 minutos. El gel se incubó durante 30 minutos más en ausencia de luz. Pasado este tiempo, las bandas correspondientes a citocromos se revelaron observándose de una tonalidad azul.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$

Amplificación por PCR y Clonación del Gen *ihfA-2* Flanqueado por sus Regiones Intergénicas

Con el fin de obtener la mutante $\Delta ihfA-2$ derivada de la cepa DL-1, se amplificó por PCR el gen *ihfA-2* flanqueado por sus regiones intergénicas (Figura 14), utilizando como molde ADN cromosomal de *G. sulfurreducens*. En la Figura 17, carril 1, se observa el fragmento de PCR esperado de 510 pb.

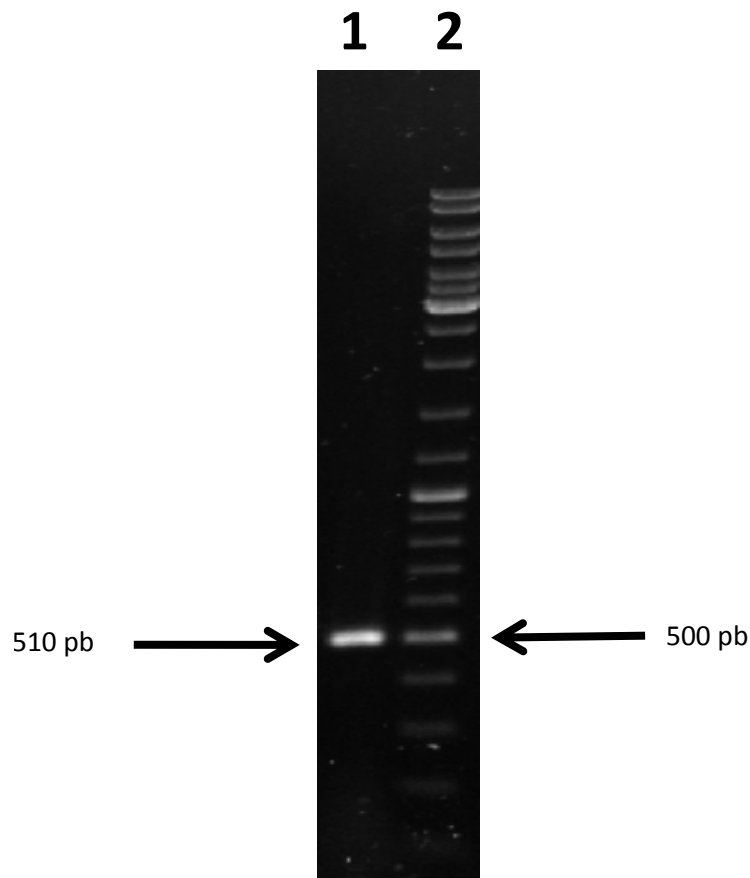
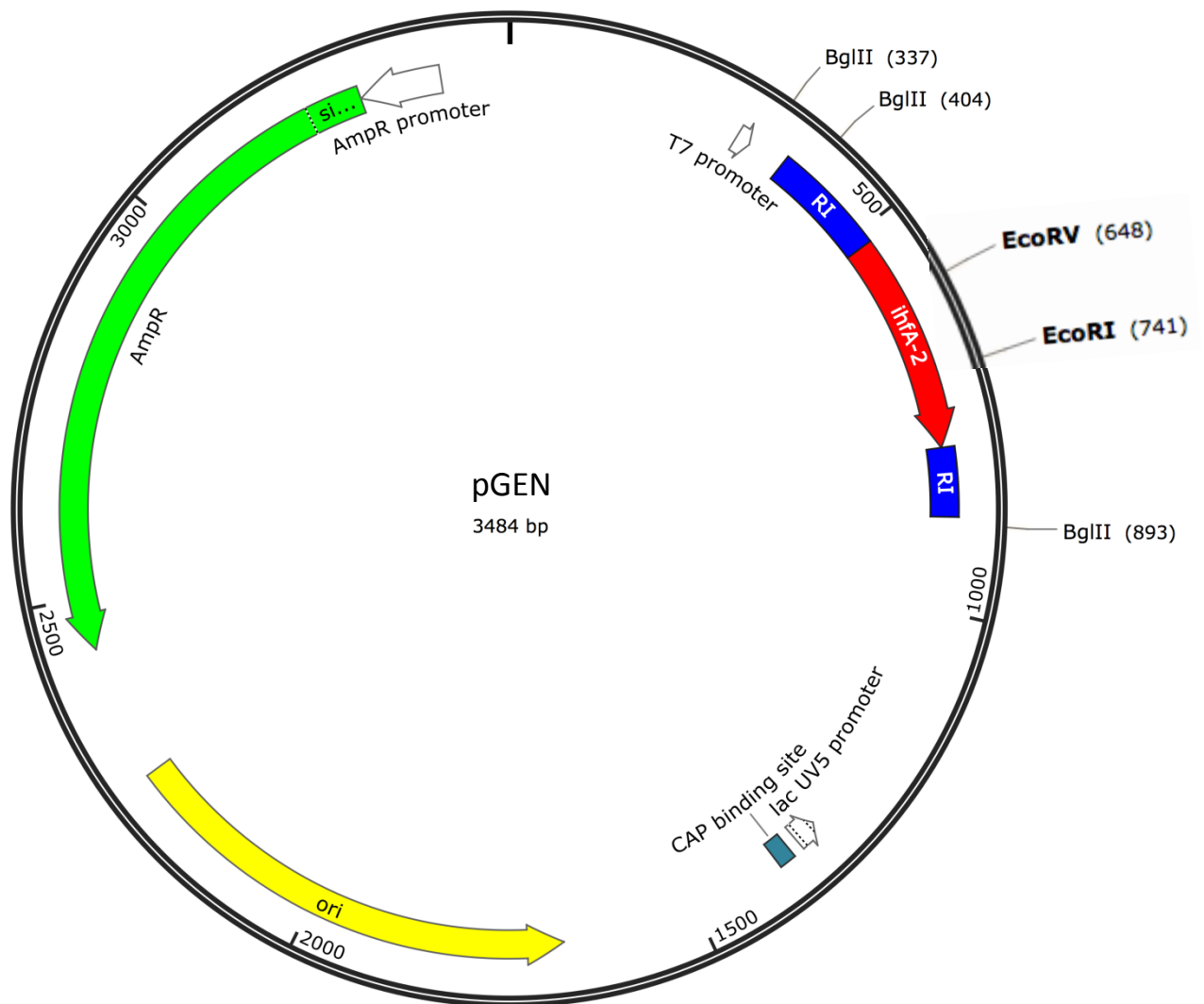


Figura 17. Amplificación del gen *ihfA-2* flanqueado por sus regiones intergénicas. Carril 1: producto de PCR 510 pb, carril 2: DNA ladder mix.

El producto de PCR (*ihfA-2* flanqueado por regiones intergénicas), se clonó en el vector pJET1.2/blunt (Thermo-scientific) transformando en la cepa XL1-blue de *E. coli* y seleccionando las colonias transformadas en medio LB con ampicilina. De las colonias que

fueron transformadas se seleccionaron varias al azar, purificando su ADN plasmídico. Este se digirió con la enzima de restricción *Bgl*II y se corrió en una electroforesis de agarosa para confirmar que la colonia tenía el plásmido recombinante con el gen *ihfA-2* y sus regiones intergénicas. En la Figura 18b se muestra el patrón de restricción: en los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 se observan dos de las tres bandas esperadas con la digestión, una de 2928 pb y otra de 489 pb (una tercera banda de 67 pb es indetectable), confirmando la clonación del fragmento de PCR. Se aisló la colonia 10 y al plásmido se le denominó pGEN.

a)



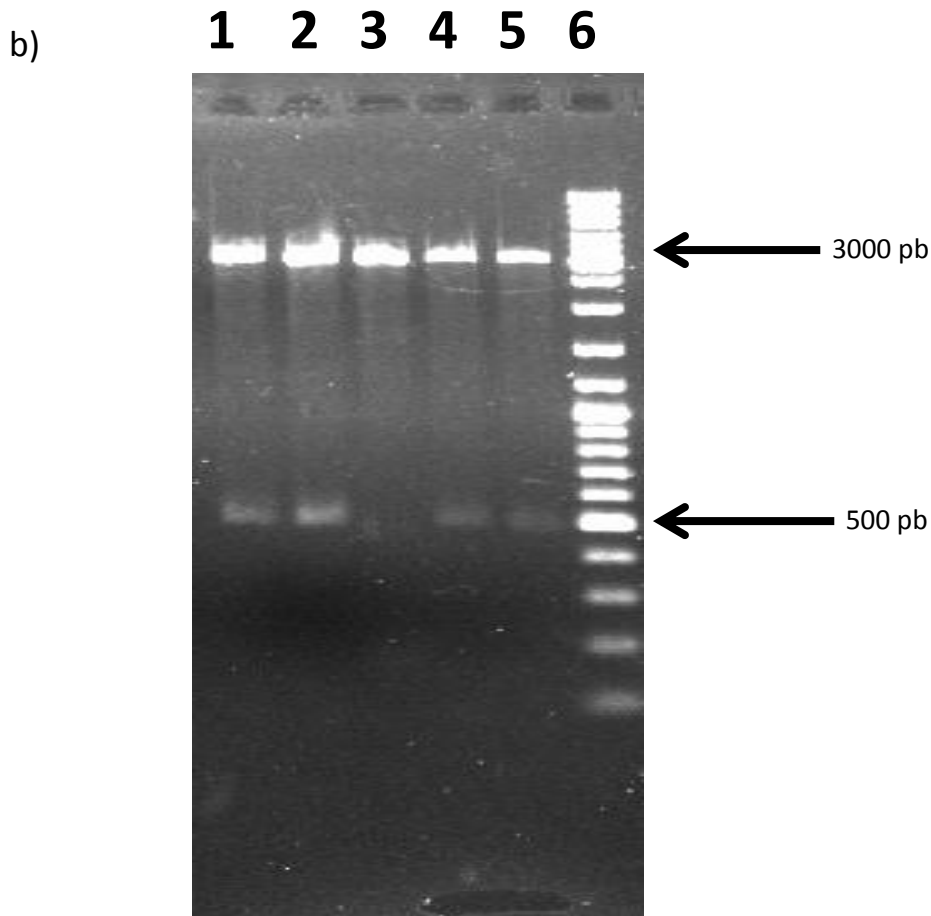


Figura 18. Patrón de restricción del gen *ihfA-2* flanqueado por regiones intergénicas clonado en pJET1.2/blunt. a) Mapa del vector con sus sitios de restricción. RI, región intergénica. b) Carril 1-5: ADN plasmídico de las colonias 1, 7, 9, 10 y 15 respectivamente, digeridas con *BglII*; carril 6: DNA ladder mix.

Construcción del Plásmido pGENR

Una vez analizado el patrón de restricción y confirmada la clonación del producto de PCR en el vector pJET1.2/blunt, se procedió a realizar una deleción sobre el gen *ihfA-2*, aprovechando la presencia de los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* en este gen (véase diagrama pGEN). En primer lugar, se llevó a cabo una digestión del plásmido pGEN con la enzima de restricción *EcoRI*. Con el producto de la digestión se corrió una electroforesis de agarosa para confirmar la linealización del vector, tal como se muestra en la Figura 19. En el carril 1 se observa la banda esperada con la digestión, la cual es de 3484 pb.

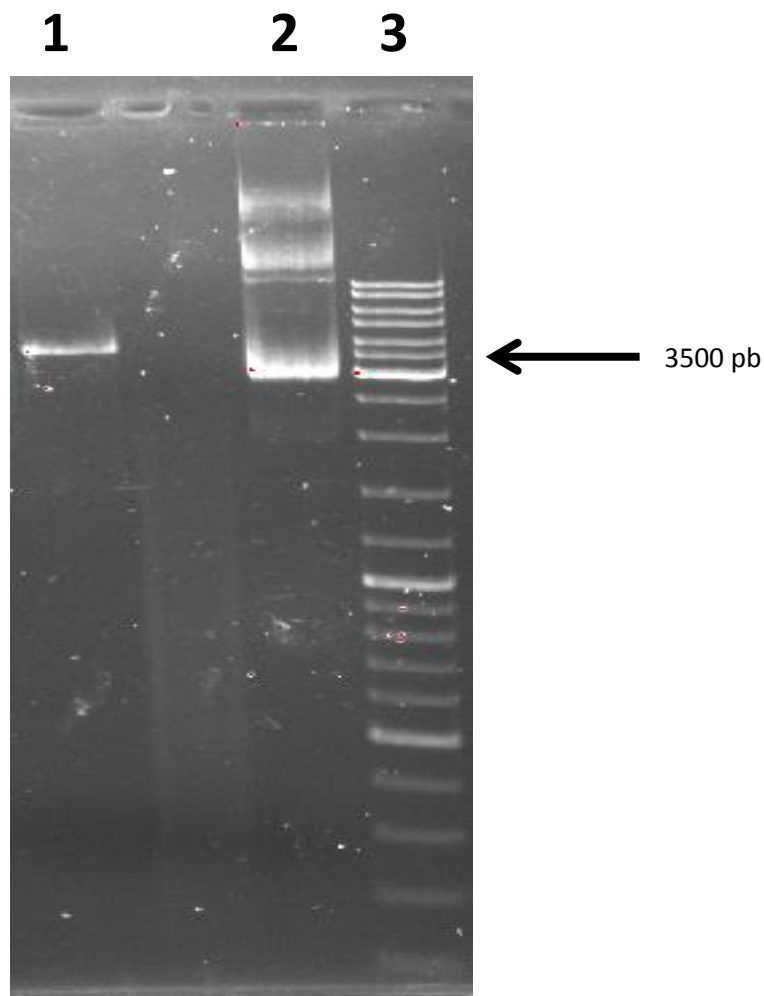
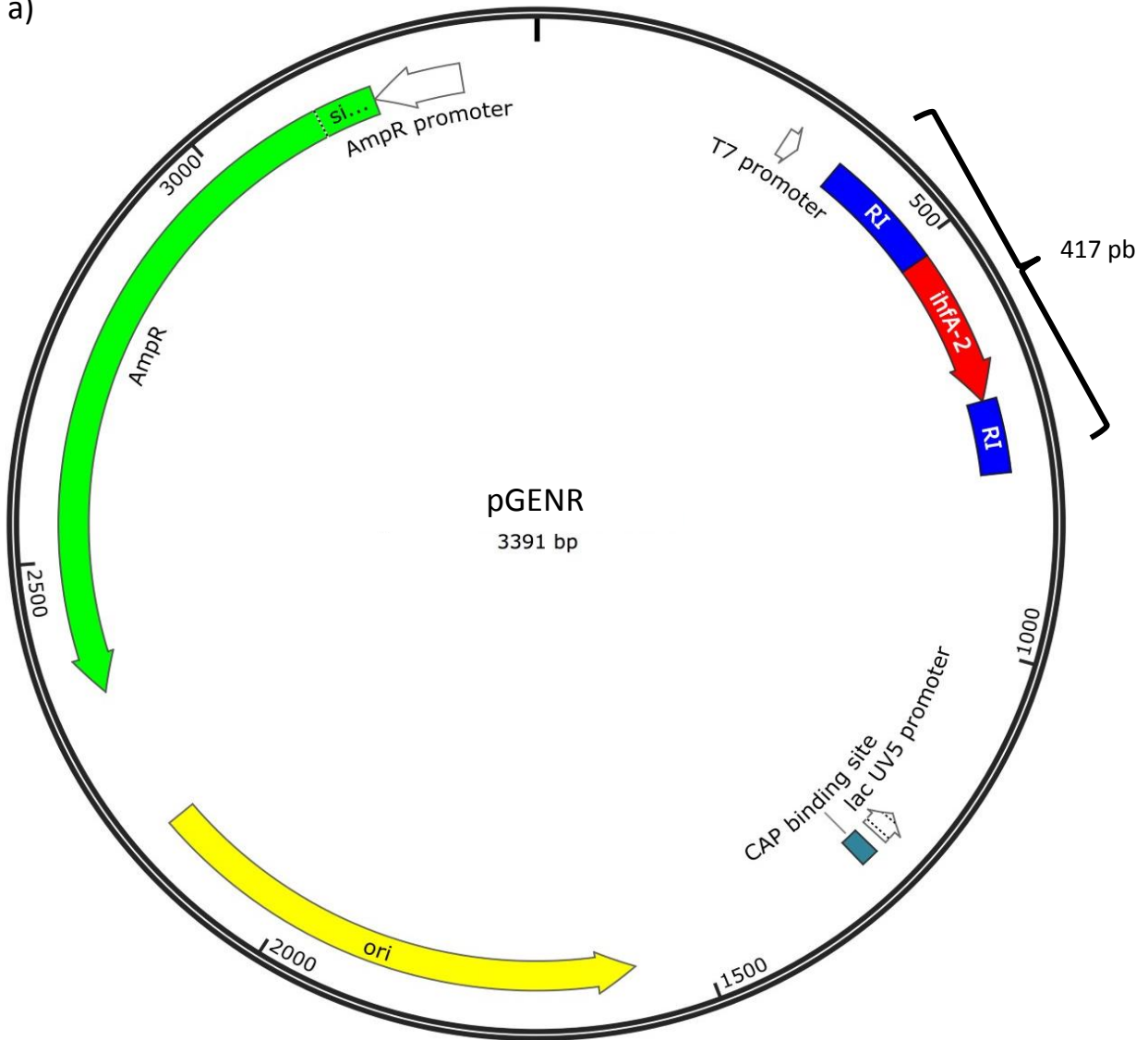


Figura 19. Patrón de restricción del vector pGEN. Carril 1: Plásmido pGEN digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, carril 2: plásmido pGEN sin digerir, carril 3: DNA ladder mix.

Posteriormente, el vector pGEN linealizado se purificó de banda a partir del gel de agarosa. Una vez purificado, se trató con la enzima de restricción *EcoRV* con el fin de llevar a cabo la delección anteriormente mencionada. Antes de religar el vector en sus extremos libres, se reparó el extremo cohesivo generado por el corte de la enzima de restricción *EcoRI*, utilizando la exonucleasa de cadena sencilla *Blunting enzyme*. Los extremos rasurados generados fueron religados y la cepa XL1-blue de *E. coli* fue transformada con el producto de la ligación. Las colonias transformadas se seleccionaron en medio LB con ampicilina. De las colonias que fueron transformadas se seleccionaron varias al azar, purificando su ADN plasmídico. Este se digirió con la enzima de restricción *BglII* y se corrió en una electroforesis de agarosa para confirmar que la colonia tenía el plásmido con el gen *ihfA-2* deletado, comparándolo con el patrón de restricción del plásmido pGEN no alterado. En la Figura 20b se muestra el patrón de restricción: en los carriles 2 y 4 se observan dos de las tres bandas esperadas con la digestión, una de 2928 pb y otra de 396 pb (una tercera

banda de 67 pb es indetectable), confirmando la escisión realizada con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV*, cuyo corte removió un total de 93 pb. Se aisló la colonia 2 y al plásmido se le denominó pGENR.

a)



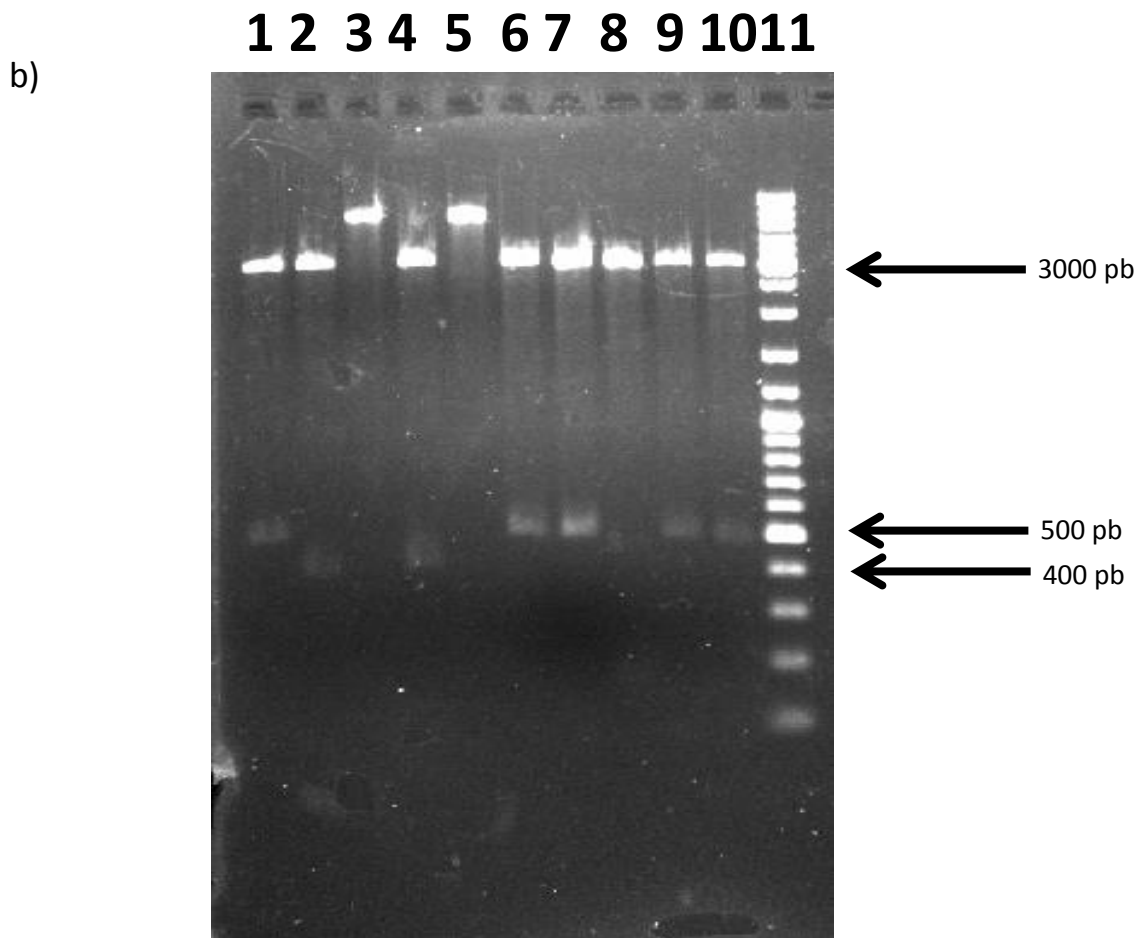


Figura 20. Patrón de restricción del plásmido pGENR. a) Mapa del vector pGENR. Se muestra la longitud del fragmento *ihfA-2* flanqueado por sus regiones intergénicas posterior al corte. RI, región intergénica. b) Carril 1-10: ADN plasmídico de las colonias 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 20 respectivamente, digeridas con *BglII*; carril 11: DNA ladder mix.

La finalidad de llevar a cabo la delección de un fragmento dentro del gen *ihfA-2* fue que este perdiera su función y, como se explica más adelante, cointegrarlo al cromosoma de *G. sulfurreducens*. Para corroborar totalmente el corte realizado sobre este gen, el plásmido pGENR fue secuenciado. El resultado de la secuencia indicó que efectivamente 93 pb fueron escindidas después del corte con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* (lo que corresponde, en términos del péptido sintetizado, a 31 aminoácidos). Para ilustrar la región del DNA que fue eliminada del gen *ihfA-2* silvestre, se llevó a cabo un alineamiento entre la secuencia original del gen silvestre flanqueado por sus regiones intergénicas y la secuencia obtenida tras la delección, utilizando el programa SerialCloner 2.6, el cual se muestra en la Figura 21.

Seq_1	1	TTCCATCGTGCATTTGCTTGATCATTCGAAGCAGATCTGAATATTTACCTTGAGAATCT	60
Seq_2	1	TTCCATCGTGCATTTGCTTGATCATTCGAAGCAGATCTGAATATTTACCTTGAGAATCT	60
Seq_1	61	CTATCAACATAGAGTAACTTTGTCCCCTCTCCCCTCCCCGAACCGGGGAGGGGTTTCA	120
Seq_2	61	CTATCAACATAGAGTAACTTTGTCCCCTCTCCCCTCCCCGAACCGGGGAGGGGTTTCA	120
Seq_1	121	ATCATCTTCTGGTAAACGGAGCAATA ATGACTAAGGCAGATATTGTTGAAAGAGTTTCCG	180
Seq_2	121	ATCATCTTCTGGTAAACGGAGCAATA ATGACTAAGGCAGATATTGTTGAAAGAGTTTCCG	180
Seq_1	181	ACCGGTGTGGAATTTCGAAGAAAGATTCCATTGAAATGGTCGAGTTGGTTTTTCAGCATTC	240
Seq_2	181	ACCGGTGTGGAATTTCGAAGAAAGATTCCATTGAAATGGTCGAGTTGGTTTTTCAGCATTC	240
Seq_1	241	TGAAGAACACCCTTGAGATTGGAGAGGATATAAAGATATCCGGCTTCGGGAAATTTGAAA	300
Seq_2	241	TGAAGAACACCCTTGAGATTGGAGAGGATATAAAGATA-----	278
Seq_1	301	TTAAAAACAAGCACGCCCGCAAAGGCAGGAACCCTCAAACAGGTGATGCCATTACCATTG	360
Seq_2	279	-----	278
Seq_1	361	AGCCAGAAGAATTCTAACGTTCAAACCGAGCACCATTCTGAAAAACAACATAAACTCTT	420
Seq_2	279	----- ATTCTAACGTTCAAACCGAGCACCATTCTGAAAAACAACATAAACTCTT	327


```

Seq_1  421  AATAGCACCATCAGCCCCAAGTCGTCCAAAACTTTACAACTGCCCCGCTCACACCTGCC  480
          |||
Seq_2  328  AATAGCACCATCAGCCCCAAGTCGTCCAAAACTTTACAACTGCCCCGCTCACACCTGCC  387

Seq_1  481  CCCCTATAGATTATAGTCGTAGGGGAATC  510
          |||
Seq_2  388  CCCCTATAGATTATAGTCGTAGGGGAATC  417

```

Figura 21. Alineamiento de las secuencias del gen *ihfA-2* silvestre (secuencia 1) y el gen *ihfA-2* deletado (secuencia 2), flanqueados por sus regiones intergénicas. El locus *ihfA-2* se resalta en negritas.

Al remover 93 pb de la secuencia del gen *ihfA-2* se producirá una proteína anómala, es decir, la proteína sintetizada a partir de este gen (la subunidad Ihf α -2 del complejo heterodimérico IHF), será deficiente en 31 aminoácidos, impidiendo de esta forma llevar a cabo su posible función regulatoria.

Construcción del Plásmido pHAM

Una vez llevada a cabo la delección sobre el gen *ihfA-2* de *G. sulfurreducens* se procedió a subclonar el fragmento deletado flanqueado por sus regiones intergénicas en el vector pK18mobsacB. Para lo anterior, se amplificó por PCR el gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas utilizando los oligonucleótidos IHFA2EcoFw e IHFA2Ecorev, generándole un sitio para corte con la enzima *EcoRI* a cada extremo del producto de PCR, utilizando como molde el plásmido pGENR. En la Figura 22, carril 1, se observa el producto de PCR esperado de 433 pb. A la par, se llevó a cabo la digestión del plásmido pK18mobsacB con la enzima de restricción *EcoRI*. Con el producto de la digestión se corrió una electroforesis de agarosa para confirmar la linealización del vector, tal como se muestra en la Figura 22. En el carril 2 se observa la banda esperada con la digestión, la cual es de 5719 pb, la longitud total de dicho vector. Posteriormente, tanto el producto de PCR como el vector pK18mobsacB linealizado se purificaron de banda a partir del gel de agarosa. Una vez purificado, el producto de PCR se trató con la enzima de restricción *EcoRI* con el fin de generarle extremos cohesivos idénticos a los del vector linealizado, esto para aumentar la probabilidad y la eficiencia de la reacción de ligación.

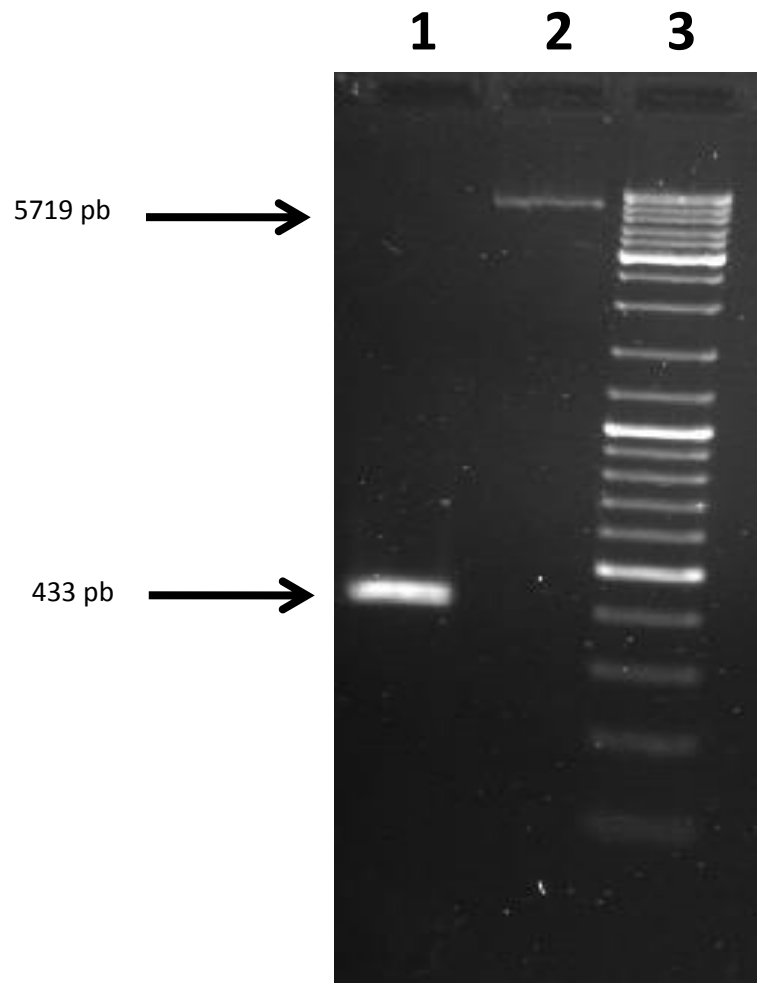
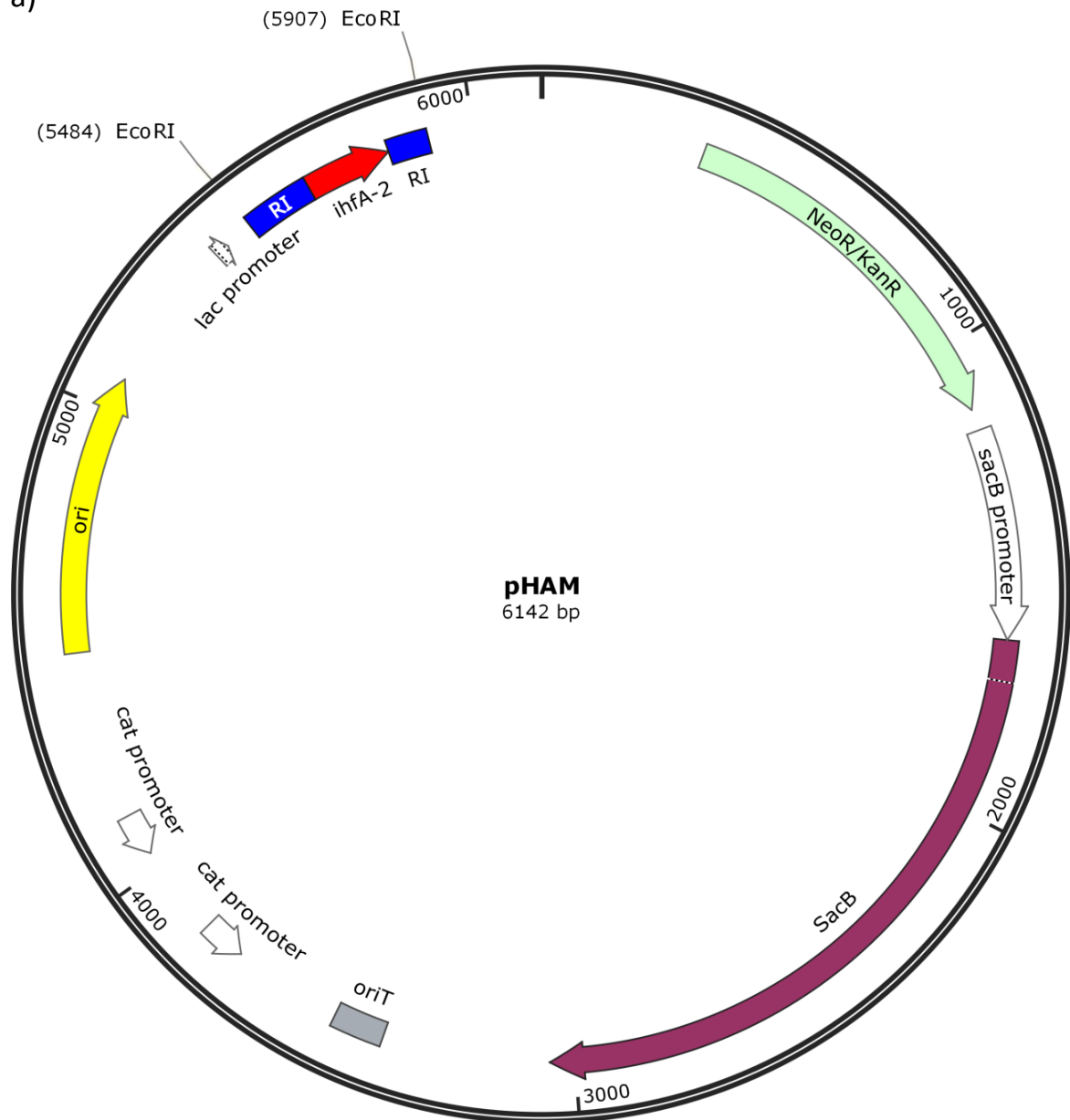


Figura 22. Amplificación del gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas con sitios de corte para *EcoRI* en los extremos, y digestión del vector pK18mobsacB. Carril 1: producto de PCR 433 pb, carril 2: plásmido pK18mobsacB digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, carril 3: DNA ladder mix.

Una vez digerido, el producto de PCR se ligó en el vector pK18mobsacB, transformando la reacción en la cepa XL1-blue de *E. coli* y seleccionando las colonias transformadas en medio LB con kanamicina. De las colonias que fueron transformadas se seleccionaron varias al azar, purificando su ADN plasmídico. Este se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* (puesto que si la ligación fue exitosa, los sitios de corte para *EcoRI* fueron restablecidos en el nuevo plásmido) y se corrió en una electroforesis de agarosa para confirmar que la colonia tenía el plásmido recombinante con el gen *ihfA-2*^{deletado} y sus regiones intergénicas. En la Figura 23b se muestra el patrón de restricción: en el carril 12 se observan las dos bandas esperadas con la digestión, una de 5719 pb y otra de 423 pb,

confirmando la clonación del fragmento de PCR. Se aisló la colonia 6 y al plásmido se le denominó pHAM.

a)



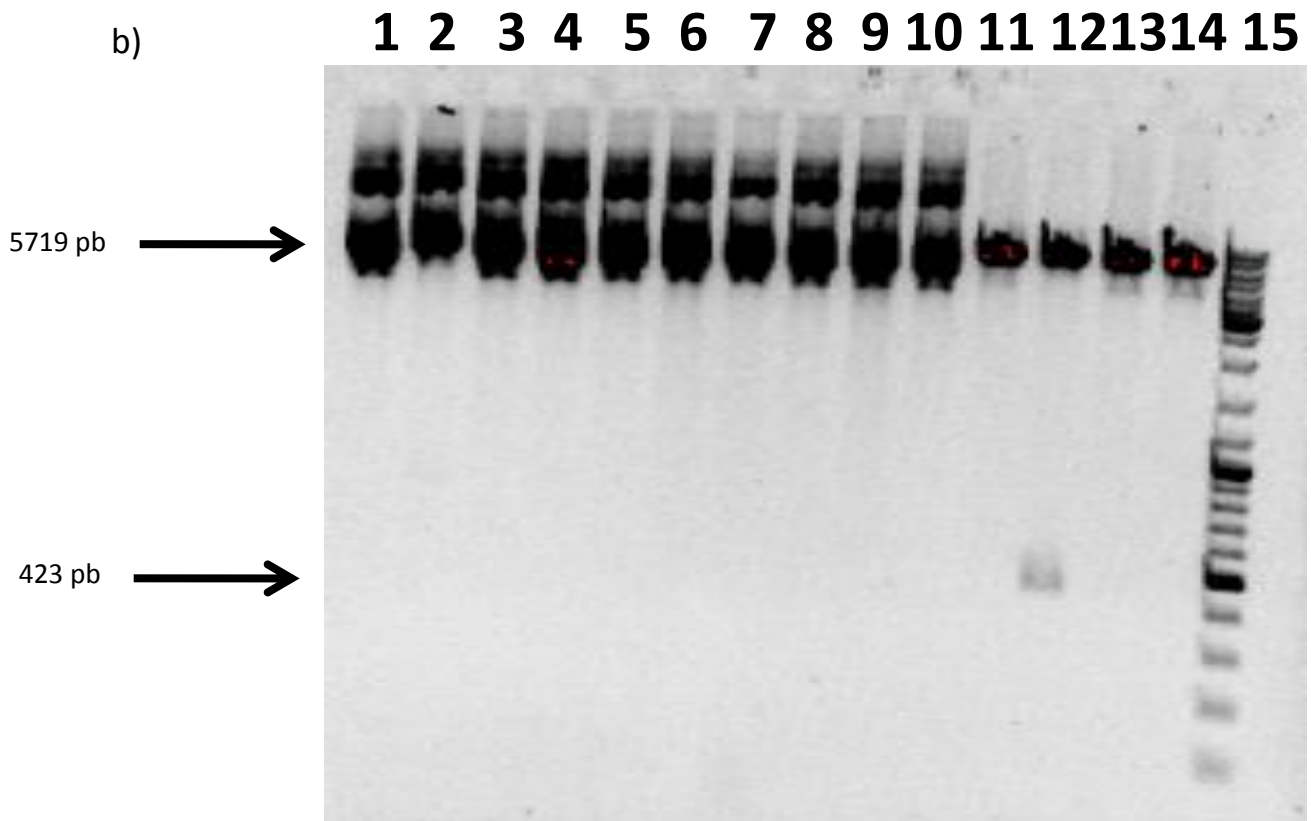


Figura 23. Patrón de restricción del plásmido pHAM. a) Mapa del vector pHAM. RI, región intergénica. b) Carril 1-14: ADN plasmídico de las colonias 30, 27, 24, 22, 20, 19, 18, 17, 15, 11, 8, 6, 4 y 2 respectivamente, digeridas con *EcoRI*; carril 15: DNA ladder mix.

Una vez obtenida la construcción del plásmido pHAM, se transformó con este la cepa S17-1 de *E. coli*, la cual posee genes de transferencia por conjugación integrados en su cromosoma que permiten la transferencia directa de plásmidos a una célula receptora. Se seleccionaron las colonias transformadas en medio LB con kanamicina. De las colonias que fueron transformadas se seleccionaron varias al azar, purificando su ADN plasmídico. Este se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se corrió en una electroforesis de agarosa para confirmar que la colonia tenía el plásmido recombinante con el gen *ihfA-2^{deletado}* y sus regiones intergénicas. En la Figura 24 se muestra el patrón de restricción: en los carriles 1-10 se observan las dos bandas esperadas con la digestión, una de 5719 pb y otra de 423 pb, confirmando la transformación de la cepa S17-1 de *E. coli* con el plásmido pHAM. Finalmente, se aisló la colonia 23.

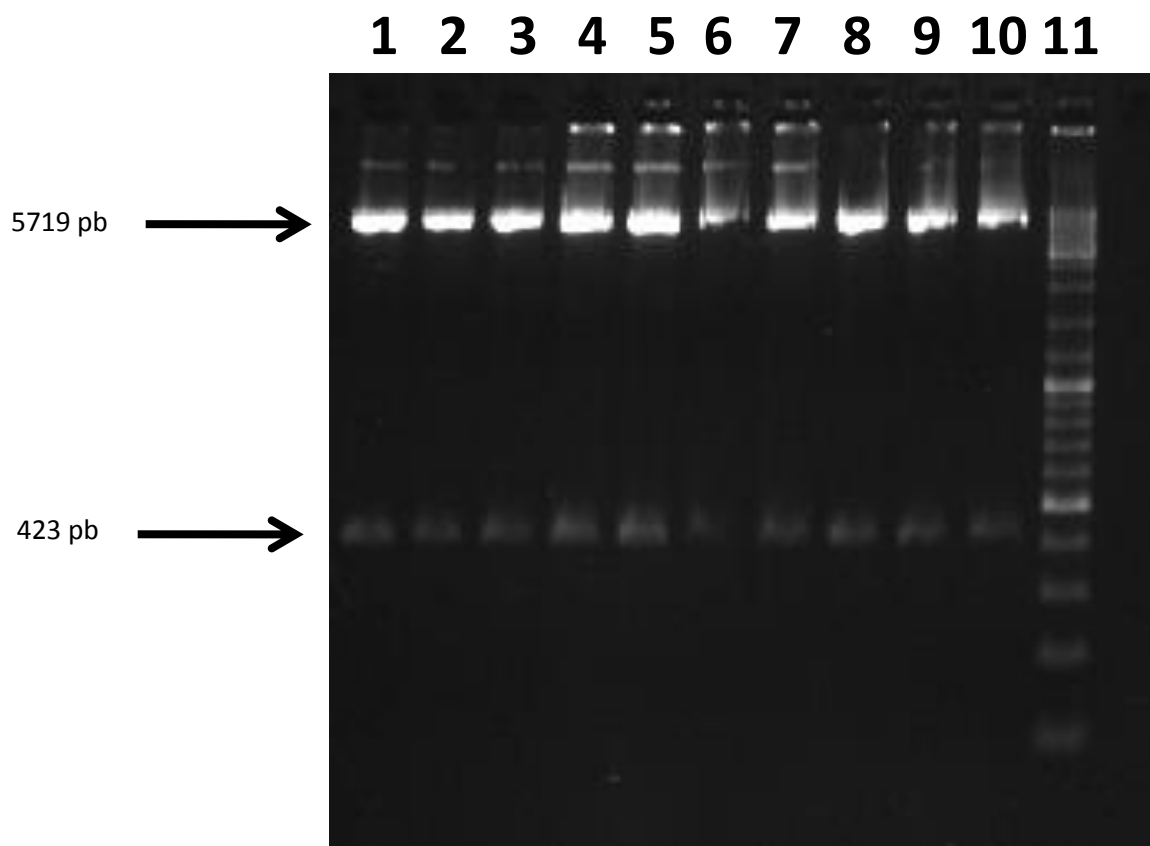


Figura 24. Patrón de restricción del plásmido pHAM obtenido de la cepa S17-1 de *E. coli*. Carril 1-10: ADN plasmídico de las colonias 1, 4, 7, 12, 14, 17, 18, 23, 30 y 35, respectivamente, digeridas con *EcoRI*; carril 11: DNA ladder mix.

Conjugación y Cointegración del Vector pHAM en el Cromosoma de *G. sulfurreducens* DL-1

Algunas cepas de *E. coli*, como es el caso de la cepa S17-1, son capaces de llevar a cabo la transferencia de plásmidos que contienen genes de movilización (*mob*) y un origen de transferencia (*oriT*) hacia *G. sulfurreducens*. Estos elementos están presentes en el vector pK18mobsacB, que fue modificado en este trabajo para contener una versión alterada del gen *ihfA-2* de *G. sulfurreducens* (*ihfA-2^{deletado}*) y regiones homólogas flanqueando dicho gen, en este caso, las regiones intergénicas. El resultado fue la construcción del plásmido pHAM, el cual fue transferido a la cepa DL-1 de *G. sulfurreducens* utilizando la cepa S17-1 de *E. coli* como bacteria donadora, mediante un proceso de conjugación, con la finalidad de que este plásmido se cointegrara al cromosoma de *G. sulfurreducens*. Los transconjugantes se sembraron en medio NBAF sólido con kanamicina. Después de aproximadamente dos

semanas, se observó la presencia de colonias características de *G. sulfurreducens*, como se muestra en la Figura 25.

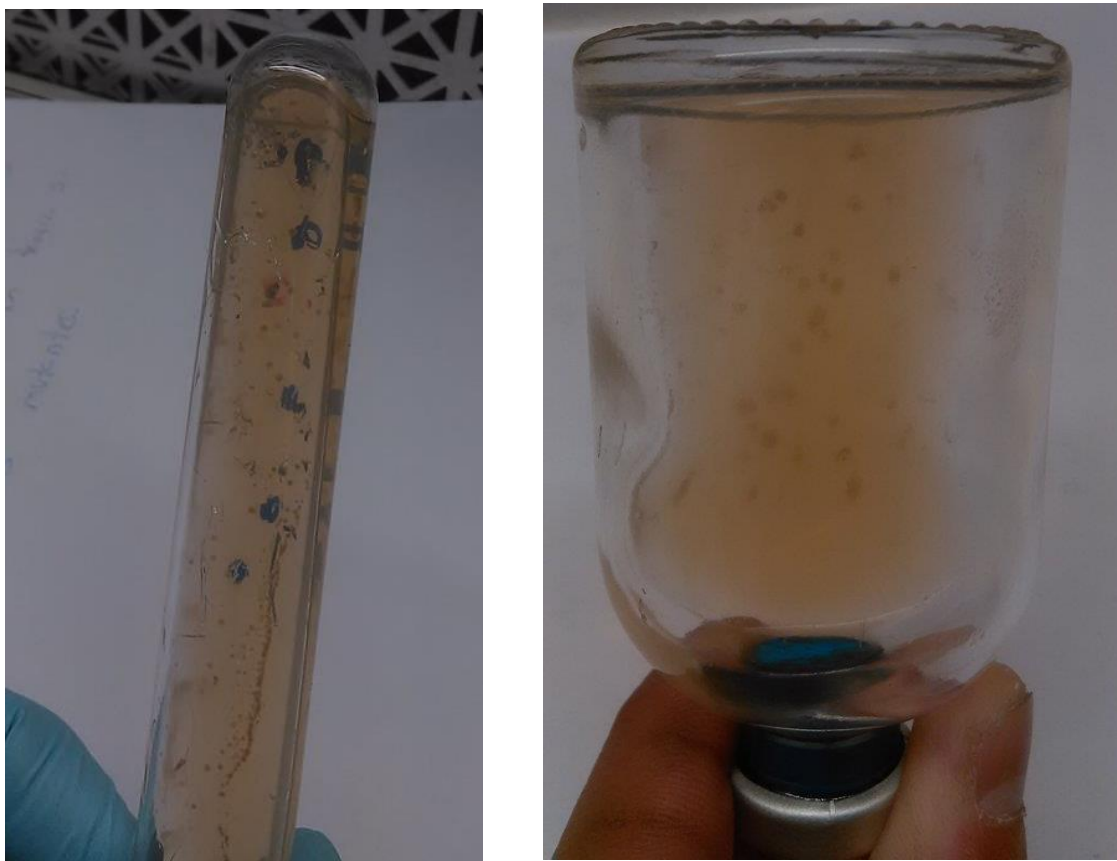


Figura 25. Crecimiento de colonias de *G. sulfurreducens* en medio NBAF-kanamicina. Se observan colonias rojas (debido a la presencia de una gran cantidad de citocromos), redondas, convexas y de aspecto cremoso, características de *G. sulfurreducens*.

El vector pK18mobsacB es un plásmido suicida, es decir, es un plásmido incapaz de replicarse en *G. sulfurreducens*. Por lo tanto, después del proceso de conjugación, el crecimiento de colonias en medio NBAF-kanamicina sugirió la cointegración del vector pHAM al cromosoma de *G. sulfurreducens*, pudiendo de esta forma crecer con el antibiótico mencionado. Se seleccionaron 10 colonias al azar y fueron sembradas en condiciones anaerobias en medio líquido NBAF-kanamicina. Los medios se incubaron durante 2-7 días a 30°C. Una vez observado crecimiento, se comprobó la cointegración del vector pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens*. Para lo anterior, se extrajo DNA cromosomal a cada una de las candidatas seleccionadas y se utilizó como molde para amplificar por PCR el gen

ihfA-2 flanqueado por sus regiones intergénicas utilizando los oligonucleótidos IHFA2EcoFw e IHFA2Ecorev. En la Figura 26, carriles 1 y 2, se observan los dos fragmentos de PCR esperados: uno de 510 pb (correspondiente al gen *ihfA-2* silvestre y sus regiones intergénicas) y otro de 417 pb (correspondiente al gen *ihfA-2*^{deletado} y sus regiones intergénicas), confirmando de esta forma la cointegración del vector pHAM en el cromosoma de las candidatas de *G. sulfurreducens* seleccionadas.

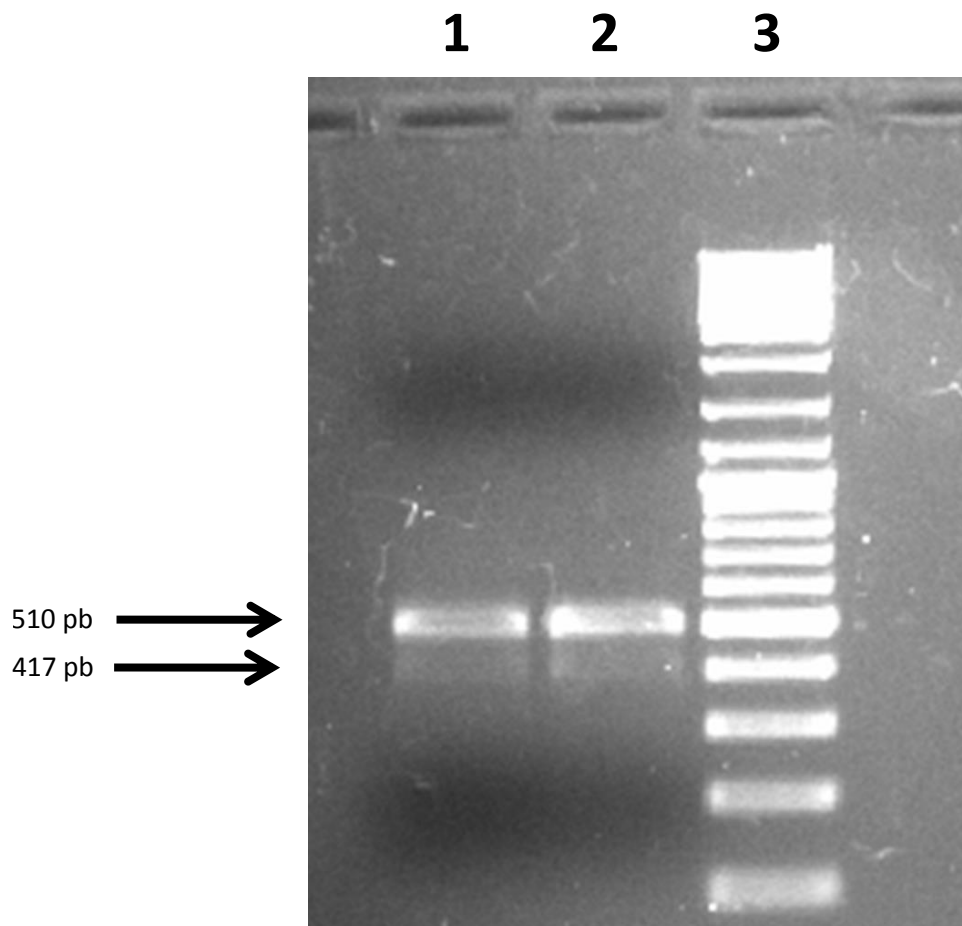


Figura 26. Comprobación de la cointegración del plásmido pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens*. Carril 1-2: productos de PCR de 510 pb (gen *ihfA-2* silvestre flanqueado por sus regiones intergénicas) y 417 pb (gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas); carril 3: DNA ladder mix.

La cointegración del plásmido pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens* se dio a través de un evento de recombinación homóloga sencilla entre las regiones intergénicas (homólogas) que flanquean el gen *ihfA-2*, tal como se muestra en la Figura 27.

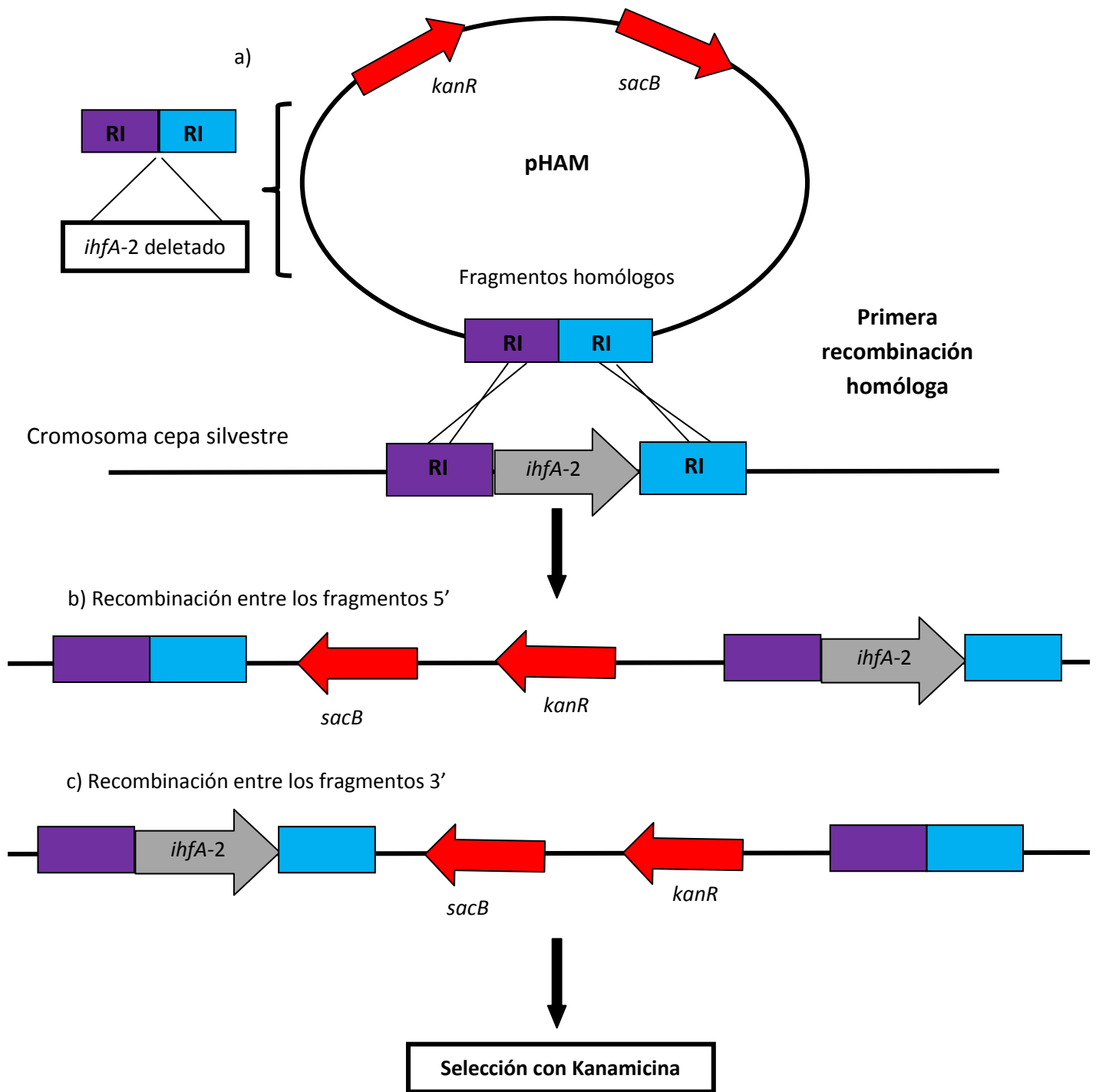


Figura 27. Cointegración del plásmido pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens*. a) Representación esquemática de los dos posibles sitios de recombinación del plásmido pHAM en el cromosoma de *G. sulfurreducens*. b) Arreglo génico del locus *ihfA-2* después de la cointegración del plásmido pHAM en la región 5' (antes del gen *ihfA-2*). c) Arreglo génico del locus *ihfA-2* después de la cointegración del plásmido pHAM en la región 3' (después del gen *ihfA-2*). RI, región intergénica.

Delección del Gen *ihfA-2* Mediante Contraselección con Sacarosa/*sacB*

En contraste con los marcadores de selección (por ejemplo, la resistencia a kanamicina), los marcadores de contraselección se utilizan para eliminar elementos no deseados. El nombre de “contraselección” se debe a que estos métodos causan la muerte de las células que poseen un gen que impide que el microorganismo pueda crecer en determinadas condiciones, mientras que su ausencia permite el crecimiento. Se han reportado diversos estudios exitosos en bacterias utilizando sistemas de contraselección en donde un gen letal condicional fue incorporado dentro de un vector (Kino y col., 2016).

Uno de los marcadores de contraselección más utilizados es el gen *sacB*, el cual confiere sensibilidad a la sacarosa (Chan y col., 2015). El gen *sacB* de *Bacillus subtilis* codifica para una enzima llamada levansacarasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de sacarosa y la síntesis de polímeros de fructosa llamados levanos. Se ha observado que la expresión de levansacarasa en bacterias gram negativas es tóxica en presencia de sacarosa. En *E. coli* la enzima se secreta al espacio periplásmico entre la membrana interna y la externa, pero realmente es poco lo que se sabe acerca de las bases moleculares de la toxicidad de los levanos en gram negativos (Méndez-Lorenzo y col., 2015). Por su parte, la expresión del gen *sacB* en presencia de sacarosa en *G. sulfurreducens* tuvo también un efecto inhibitorio en el crecimiento de esta bacteria (Chan y col., 2015).

El vector pK18mobsacB utilizado en este proyecto posee en su secuencia una versión modificada del gen *sacB*, en la cual se han eliminado los sitios para las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (Simon y col., 1983). Debido a que el plásmido pHAM se cointegró en el cromosoma de *G. sulfurreducens*, esta última posee ahora una copia del gen *sacB* en su genoma.

Las colonias de *G. sulfurreducens* resistentes a kanamicina se sembraron en placas con medio NBAF sólido con sacarosa al 10%. Al agregar sacarosa al medio, se favorece un segundo proceso de recombinación. La sacarosa ejerce una presión de selección causada por la toxicidad de los levanos que obliga a las células a expulsar el plásmido previamente cointegrado, ya sea con el gen *ihfA-2* silvestre o con el gen *ihfA-2*^{deletado}, generando de esta forma cepas con un fenotipo silvestre (WT) o con el alelo de delección ($\Delta ihfA-2$), tal como se ilustra en la Figura 28.

Después de aproximadamente cuatro semanas, se observó la presencia de colonias características de *G. sulfurreducens*, como se muestra en la Figura 29.

Cromosoma de *G. sulfurreducens* con el plásmido pHAM cointegrado.

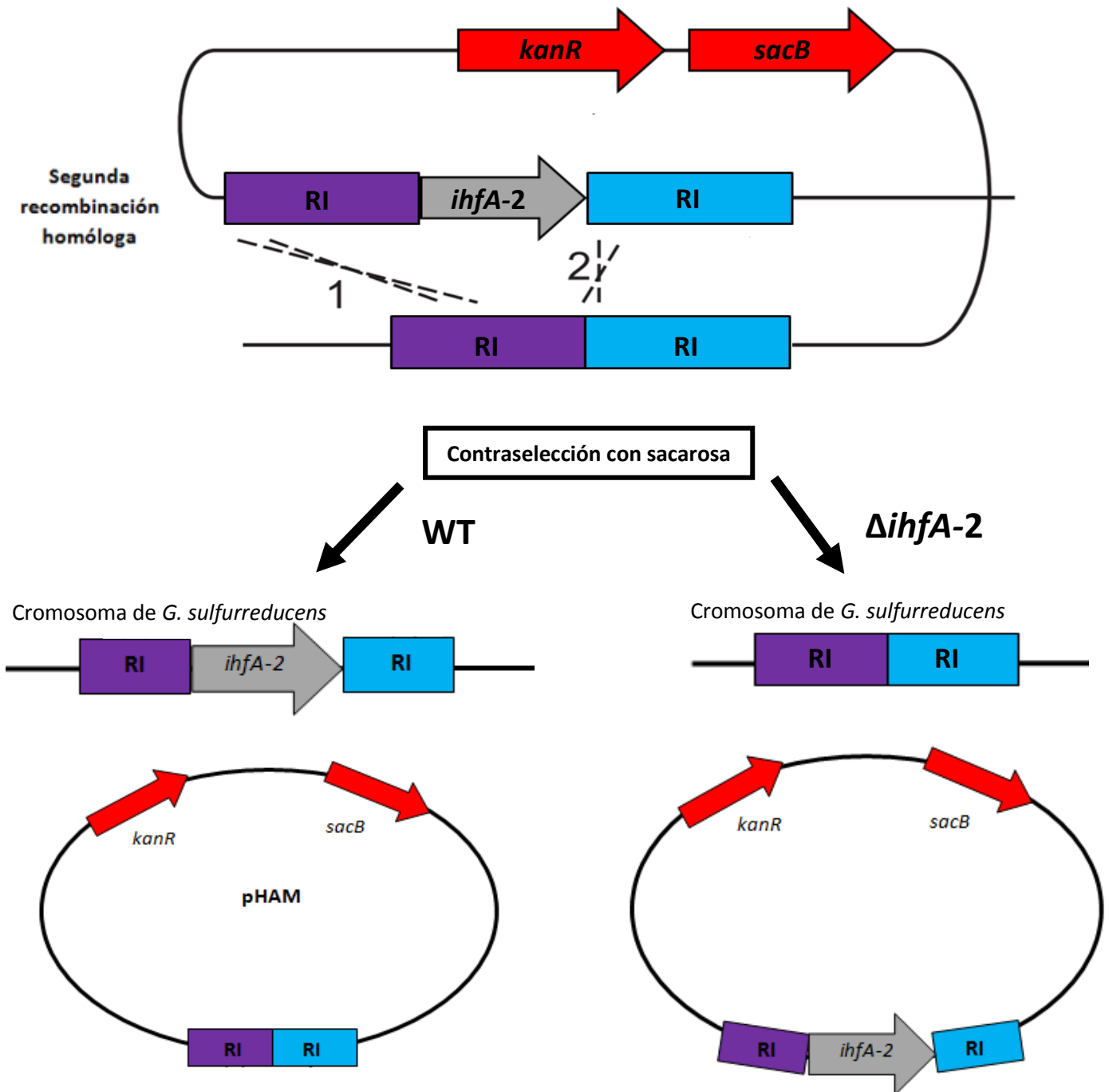


Figura 28. Segunda recombinación homóloga posterior a la cointegración del plásmido pHAM al cromosoma de *G. sulfurreducens*. Las células sembradas en sacarosa pasan por un segundo evento de recombinación homóloga que puede generar la cepa silvestre (WT) o el alelo de delección (*ihfA-2^{deletado}*). RI, región intergénica.



Figura 29. Crecimiento de colonias de *G. sulfurreducens* en medio NBAF-Sacarosa. El crecimiento en sacarosa sugiere la expulsión del plásmido previamente cointegrado en el cromosoma de *G. sulfurreducens*.

El crecimiento de colonias de *G. sulfurreducens* en medio NBAF con sacarosa sugirió la expulsión del plásmido previamente cointegrado en el cromosoma de esta bacteria. Dicho de otra manera, mediante el proceso de contraselección se eliminaron las células que no expulsaron el plásmido y este siguió dentro de su genoma, a la par de que se seleccionaron las células resistentes a sacarosa, es decir, aquellas que expulsaron el plásmido.

Para comprobar la pérdida del plásmido, se seleccionaron varias colonias al azar y fueron sembradas en medio líquido NBAF-kanamicina. Ninguna de las candidatas logró crecer en este medio, debido precisamente a la pérdida del plásmido que les confería la resistencia al antibiótico.

Como se mencionó, debido a que el plásmido pudo haber sido expulsado de dos formas diferentes (Figura 28), se pudieron haber generado dos líneas celulares distintas: una con genotipo mutante $\Delta ihfA-2$ o una con genotipo silvestre. Para identificar a la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens*, las candidatas sensibles a kanamicina fueron sembradas en medio NBAF líquido. Una vez crecidas, se extrajo DNA cromosomal a cada una de ellas y se utilizó como molde para amplificar por PCR el gen *ihfA-2* flanqueado por sus regiones intergénicas utilizando los oligonucleótidos IHFA2EcoFw e IHFA2Ecorev. En la Figura 30, carriles 2, 3, 4 y 8, se observa el fragmento de PCR esperado de 417 pb (correspondiente al gen *ihfA-2*^{deletado} y sus regiones intergénicas), confirmando de esta forma la mutación, es decir, la delección sobre el gen *ihfA-2* de las candidatas de *G. sulfurreducens* seleccionadas.

Una vez confirmada la mutación, se procedió a caracterizar la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* en cuanto a su capacidad de crecimiento en distintos medios de cultivo con diferentes donadores y aceptores de electrones. Adicionalmente, se analizó el efecto de la mutación sobre la expresión de genes relacionados con la transferencia de electrones, como *pilA* y algunos responsables de la síntesis de citocromos tipo-c.

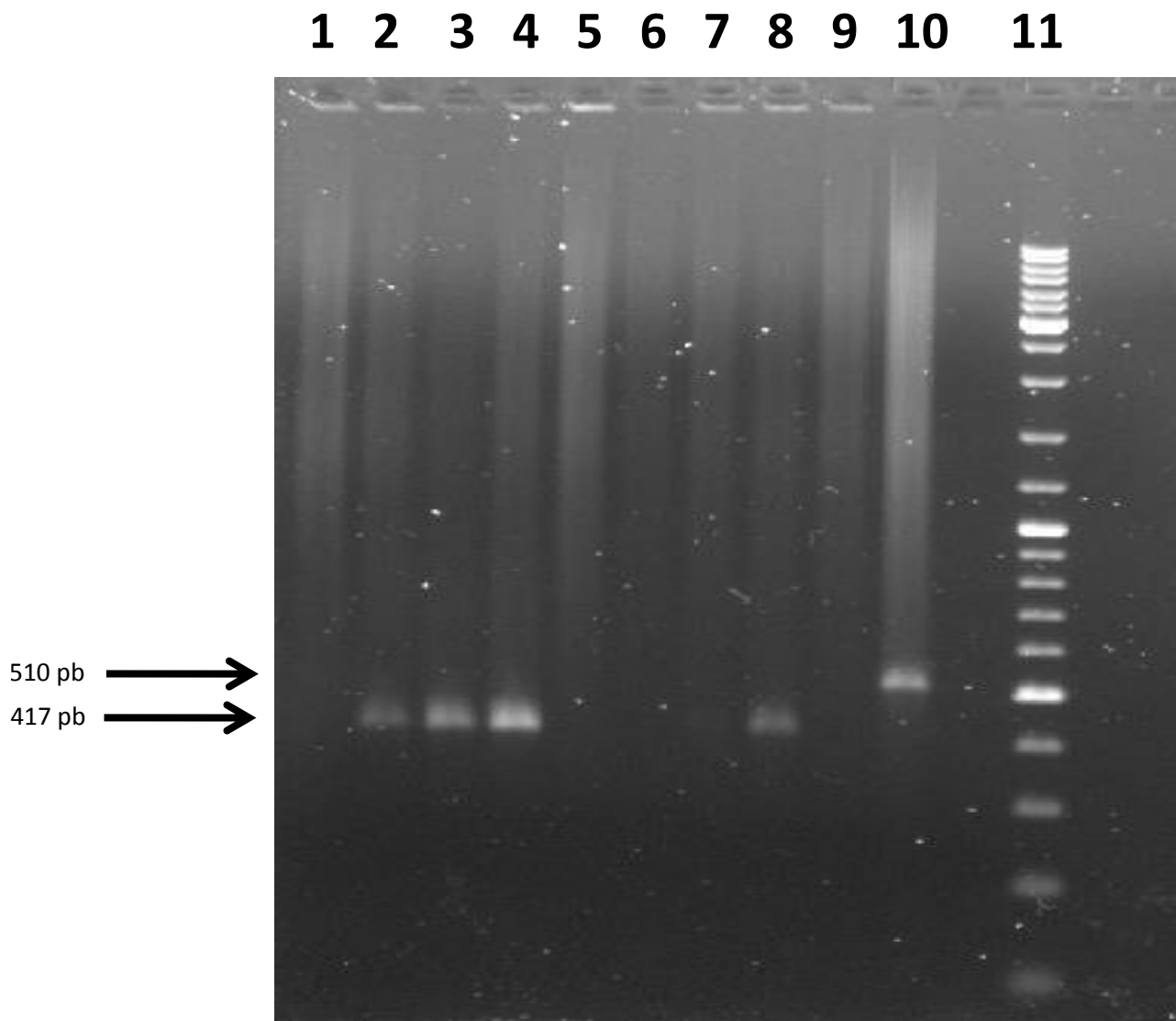
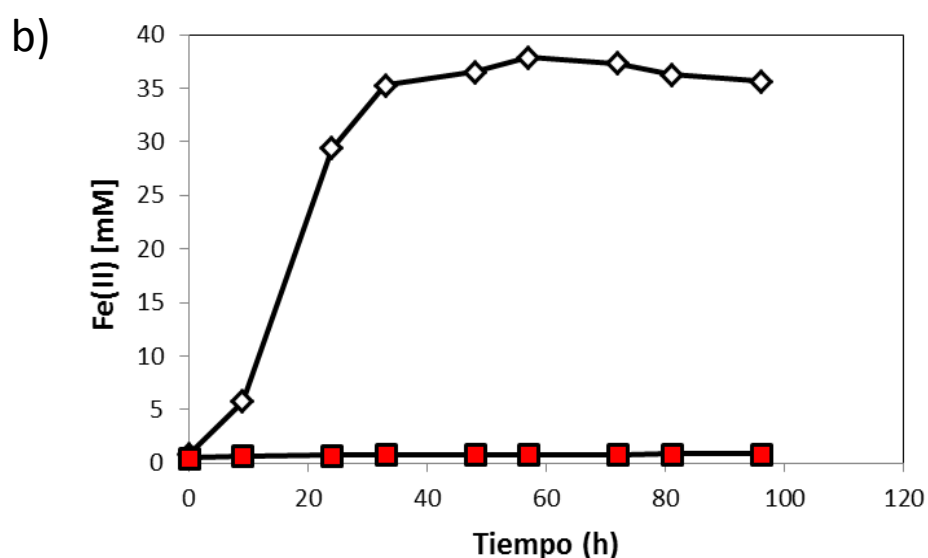
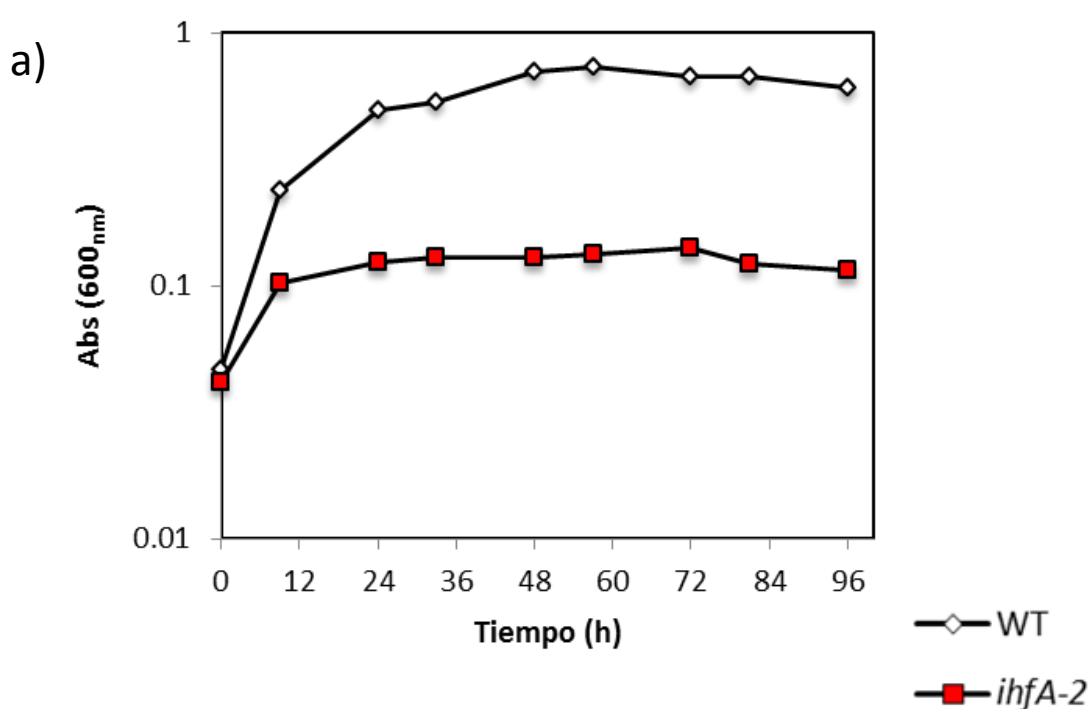


Figura 30. Confirmación de la construcción de la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens*. Carriles 2, 3, 4 y 8: producto de PCR de 417 pb (correspondiente al gen *ihfA-2*^{deletado} flanqueado por sus regiones intergénicas); carril 10: producto de PCR control de 510 pb (correspondiente al gen *ihfA-2* silvestre flanqueado por sus regiones intergénicas); carril 11: DNA ladder mix.

Caracterización de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$

Fenotipo de la Cepa Mutante $\Delta ihfA-2$

Con la finalidad de observar si la subunidad Ihf α 2 del complejo heterodimérico IHF está involucrada en los procesos de transferencia de electrones en *G. sulfurreducens*, se procedió a crecer a la cepa silvestre y a la mutante $\Delta ihfA-2$ en medios de cultivo con acetato como donador de electrones y diferentes aceptores de electrones (fumarato y Fe(III)). La Figura 31 muestra el crecimiento de las cepas de *G. sulfurreducens* en medio NBAF (acetato-fumarato) y citrato férrico (acetato-Fe(III) soluble).



c)



Figura 31. Fenotipo de las cepas de *G. sulfurreducens* con diferentes aceptores de electrones. a) Crecimiento con acetato-fumarato. b) Reducción de Fe(III) soluble a Fe(II). Se muestran valores representativos de lecturas obtenidas por triplicado. Los valores de desviación estándar son muy pequeños para ser observados. c) Observación cualitativa de la reducción de Fe(III).

Como se observa en la Figura 31a, la cepa silvestre de *G. sulfurreducens* (línea negra con rombos blancos) presenta una curva de crecimiento clásica, con la fase *lag* en las primeras 12 horas, seguido de la fase exponencial hasta las 24 horas, continuando con la fase estacionaria hasta el final de la cinética. De manera interesante, se observa que la cepa $\Delta ihfA-2$ presenta un retraso en el crecimiento durante toda la cinética, llegando a crecer hasta un máximo de 0.186 de absorbancia a las 72 horas.

En la Figura 31b se observa que la cepa silvestre de *G. sulfurreducens* alcanza un máximo de reducción de Fe(III) a Fe(II) de 38 mM en las primeras 57 horas de la cinética, manteniéndose estable hasta el final de la curva. Por su parte, al igual que en la curva de crecimiento en acetato-fumarato, la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ presenta una deficiencia en la reducción de Fe(III), ya que no reduce el metal.

La deficiencia en crecimiento y en la reducción de Fe(III) a Fe(II) en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ sugiere que el producto de este gen está participando en la regulación de la transferencia de electrones de manera global, como parte del complejo heterodimérico IHF. El crecimiento deficiente de la cepa $\Delta ihfA-2$ en medio NBAF podría deberse a que en esta cepa se está afectando el metabolismo del fumarato, ya sea a través de controlar el transporte de dicho aceptor de electrones hacia el interior de la célula o a las proteínas involucradas en su reducción. Es probable que el producto del gen *ihfA-2* esté involucrado en la activación de la expresión del gen *dcuB*, cuyo promotor contiene las regiones conservadas -24/-12 y su transcripción está dirigida por la RNA polimerasa dependiente de σ^{54} . El gen *dcuB* codifica para un transportador de fumarato/succinato, sumamente esencial durante el crecimiento de *G. sulfurreducens* con fumarato como aceptor terminal de electrones (Leang y col., 2009).

Por otra parte, el producto del gen *ihfA-2* podría estar involucrado en la activación de la transcripción del operón que codifica para las subunidades de la enzima fumarato reductasa (*frdC*, *frdA* y *frdB*). Butler y colaboradores demostraron que la delección del gen *frdA* (el cual codifica para la subunidad catalítica de la fumarato reductasa), resulta en una cepa incapaz de crecer con fumarato como único aceptor de los electrones (Butler y col., 2006). Utilizando el software en línea *Virtual Footprint* se analizó la región reguladora de este operón (500 pb río arriba del codón de inicio de la traducción) y se encontraron tres posibles sitios de unión para IHF, como se muestra en la Figura 32. No se encontraron regiones -24/-12 reconocidas por σ^{54} , sin embargo, los tres posibles sitios de unión para IHF sugieren que este complejo está involucrado en la regulación de la expresión de la fumarato reductasa, cuya ausencia vuelve incapaz a la célula de utilizar fumarato como aceptor final de los electrones.

Cabe destacar que la enzima fumarato reductasa desempeña un rol dual en el metabolismo de *G. sulfurreducens*, ya que también posee actividad de succinato deshidrogenasa. Esta actividad es necesaria para la completa oxidación de acetato y generación de energía vía ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs), lo cual explicaría la deficiencia de crecimiento en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ en caso de que el complejo IHF active su expresión (Butler y col., 2006).

Promoter Sequence:

```

1 GCGAGAATAT GGGCTTTTTG TACGCCTAAG TTGCTGCTT TCCGTGATGT TCGGCCTTTG GTTGTATCAG AACGGCCATC 80
81 AAAATGCAAC GGGGCCGTGC CCGACTCAC GGGCAGCGA GCCGATTTGC CCGGCCGCCG CCITTCTGTC CCTCTTTTGT 160
161 GCTGCAGGCC GCGTTCGTCC ACGCCACCC CCGAAAGCAG ACGGAAACTG GCTTCAGCT CTTTCCGAGC ATACTTTTTT 240
241 ATGCTTTTT CCTAAAACGA CGTTAGTAT ACAGTATACA GTATTGAGAT GAAAAAATAT TAATCTGAAT AGCATCTTCC 320
321 GGAGTCAGGC TTCACTAAAT CCTTGCAGGG GAGGGATCTA TGGACAATG TAAGGAATGG CGGCGCCGC CCGGAATGTC 400
401 TGAGTTTICC CGTGAGGTGG CCGCGTCCC GATGTGTGTC GGGCGCGGT ACGTGGTCTG AACCCAAAGA ACAACTATCT 480
481 ACGCGCAAAG GGAATCAIT ATG

```

Figura 32. Posibles sitios de unión de IHF en la región reguladora del operón fumarato reductasa. Los tres posibles sitios de unión se resaltan en color rojo. El codón de inicio de la traducción (ATG) se muestra resaltado en color azul.

El producto del gen *ihfA-2* podría estar involucrado también en la regulación de otros genes implicados en el transporte y metabolismo del acetato. El acetato es el principal donador de electrones y fuente de carbono en las especies de *Geobacter* en suelos y sedimentos. Una de las principales claves de la habilidad de *Geobacter spp.* para competir en ambientes del subsuelo es precisamente su capacidad para tomar acetato del medio que la rodea. Estudios genómicos revelaron diversas estrategias por las cuales *G. sulfurreducens* se ha adaptado para competir por acetato, por ejemplo, múltiples genes que codifican para transportadores tipo acetato permeasas (Mahadevan y col., 2011). Por tanto, como son genes relevantes para el crecimiento de la célula, es lógico que se expresen constitutivamente, es decir, independientemente de las condiciones del medio. Sin embargo, se ha reportado que el transporte y metabolismo de acetato podría estar regulado en respuesta a una gran variedad de señales ambientales, principalmente la disponibilidad de nutrientes (Mahadevan y col., 2008). Además, otros genes que codifican para enzimas involucradas en la oxidación del acetato, tales como la fumarasa (GSU0994) y acetil-CoA transferasas (GSU0174 y GSU0490), son regulados positivamente por el factor σ^{54} (Leang y col., 2009). Por tanto, el producto del gen *ihfA-2*, como parte del complejo heterodimérico IHF, podría estar actuando como un elemento adicional en la activación de la expresión de estos genes.

Está demostrado que en *G. sulfurreducens* la reducción de Fe(III) soluble es llevada a cabo por diversos citocromos tipo-c y no por enzimas reductasas (Lovley y col., 2011). Por tanto, la deficiencia en la reducción de citrato férrico en esta cepa mutante podría deberse a que el producto del gen *ihfA-2* está controlando la transcripción de genes que codifican para citocromos tipo-c relevantes en la transferencia de electrones a Fe(III) soluble. Estudios

realizados por la doctora Juárez y colaboradores demuestran que ante la ausencia del regulador PilR (EBP) en *G. sulfurreducens* (cepa DLJK3), se reduce la expresión de citocromos importantes en la transferencia de electrones, tales como OmcB (el cual es requerido para la reducción óptima de Fe(III) soluble) y OmcC (Juárez y col., 2009); y dado que IHF es indispensable para la completa activación de la transcripción de genes en los que intervienen proteínas tipo EBP, podría ser que IhfA-2 controle la transcripción de estos citocromos. Además, se conoce que en *G. sulfurreducens* las subunidades IhfA-1, IhfB-1 e IhfB-2 controlan la transcripción de los citocromos tipo-c OmcE, OmcZ, OmcB, OmcC y OmcS (Hernández-Eligio, datos no publicados). Cabe destacar que la transcripción del gen *omcB* no está dirigida por el factor σ RpoN, sino por el factor RpoS (Leang y Lovley, 2005). Por lo tanto, la regulación de *omcB* por PilR e IHF podría estar mediada de manera indirecta, posiblemente (en el caso de IHF), a través de controlar la transcripción de otro regulador transcripcional (Hernández-Eligio, datos no publicados).

El Producto del Gen *ihfA-2* Controla la Expresión de Algunos Citocromos Tipo-c

Con el fin de comprobar si la deficiencia en la reducción de citrato férrico por parte de la cepa $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* es debido a la baja expresión de diversos citocromos tipo-c involucrados en la transferencia de electrones a Fe(III) soluble, se procedió a realizar un perfil de citocromos. Para lo anterior, se crecieron las cepas silvestre y $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* en medio NBAF para posteriormente obtener las células. A partir de las células, se llevó a cabo una purificación fraccionada de proteínas, las cuales fueron corridas posteriormente en una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los citocromos tipo-c de membrana interna, periplasma y membrana externa fueron revelados con una tinción diferencial tipo hemo. El perfil de citocromos obtenido se muestra en la Figura 33.

Como se observa en la Figura 33, la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* presenta una expresión de citocromos de membrana interna y periplasma muy similar a la cepa silvestre, con una ligera disminución en la producción de algunas de estas metaloproteínas. Por otro lado, la expresión de algunos citocromos tipo-c de membrana externa, tales como OmcC, OmcB, OmcZ y OmcS se ve disminuida en la cepa mutante. Como se mencionó anteriormente, la expresión de algunos citocromos tipo-c de membrana externa, tales como OmcB, es indispensable para la reducción óptima de Fe(III) soluble. Por tanto, la deficiencia en este y otros citocromos tipo-c, tanto de membrana interna y externa como de periplasma, podrían estar afectando los procesos de transferencia extracelular de electrones hacia el Fe(III) soluble.

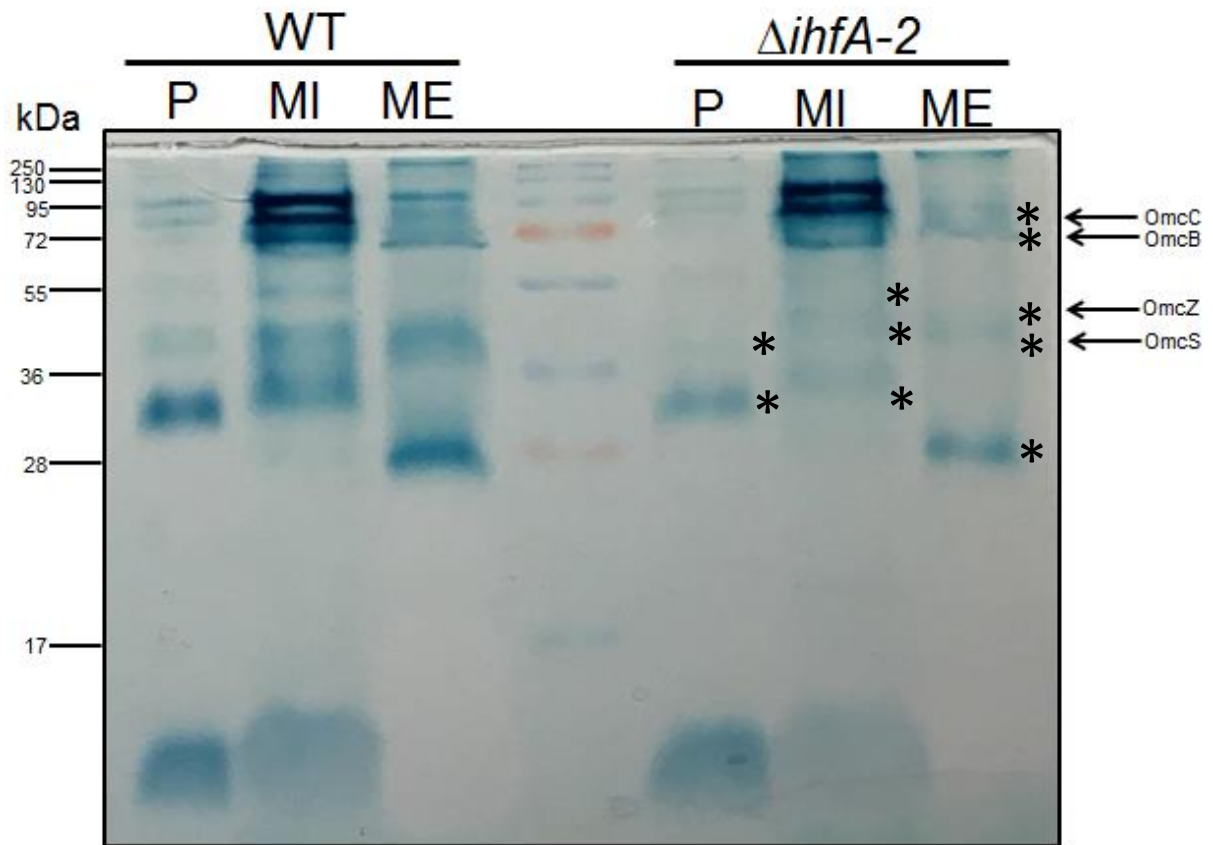


Figura 33. Perfil de citocromos de las cepas WT y $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* crecidas en medio NBAF. Se observa que la expresión de algunos citocromos se ve afectada en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$. Los citocromos tipo-c de membrana externa OmcC, OmcB, OmcZ y OmcS fueron identificados de acuerdo a sus pesos moleculares (80.6, 77.1, 49.3 y 45.3 kDa, respectivamente). P, periplasma; MI, membrana interna; ME, membrana externa. (*) señala los citocromos con baja expresión en la cepa mutante.

Se ha reportado que la pérdida del citocromo de membrana externa OmcB puede ser compensada por la expresión de múltiples citocromos cuyos genes poseen promotores dependientes de RpoS, en presencia de citrato férrico (Krushkal y col., 2009). Por tanto, el fenotipo deficiente en cuanto a la reducción de Fe(III) soluble observado en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* podría deberse finalmente a la disminución de la expresión de algún o algunos citocromos tipo-c importantes en determinados puntos de la cadena del transporte de los electrones, aunque por el perfil de citocromos tan similar observado en membrana interna y periplasma, lo más probable es que en la cepa $\Delta ihfA-2$, más allá de la alteración en la expresión de estas metaloproteínas, se estén viendo afectados principalmente genes de metabolismo central importantes para el crecimiento de esta bacteria, en cuyo caso, la deficiencia en el crecimiento explicaría por ende la deficiencia en la reducción de Fe(III) soluble.

El Producto del Gen *ihfA-2* Controla la Producción de Pilina a Nivel Transcripcional

Como se ha mencionado, el pili de *G. sulfurreducens* es un elemento indispensable en la transferencia extracelular de electrones hacia electrodos y óxidos metálicos insolubles, siendo importante para la biorremediación y generación de bioelectricidad (Lovley y col., 2011). Con la finalidad de investigar si la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ es deficiente en la producción de pili, se procedió a realizar un experimento de inmunodetección tipo Western Blot para detectar a la proteína estructural PilA. La Figura 34 muestra el resultado de la inmunodetección de PilA en las cepas silvestre y $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens*.

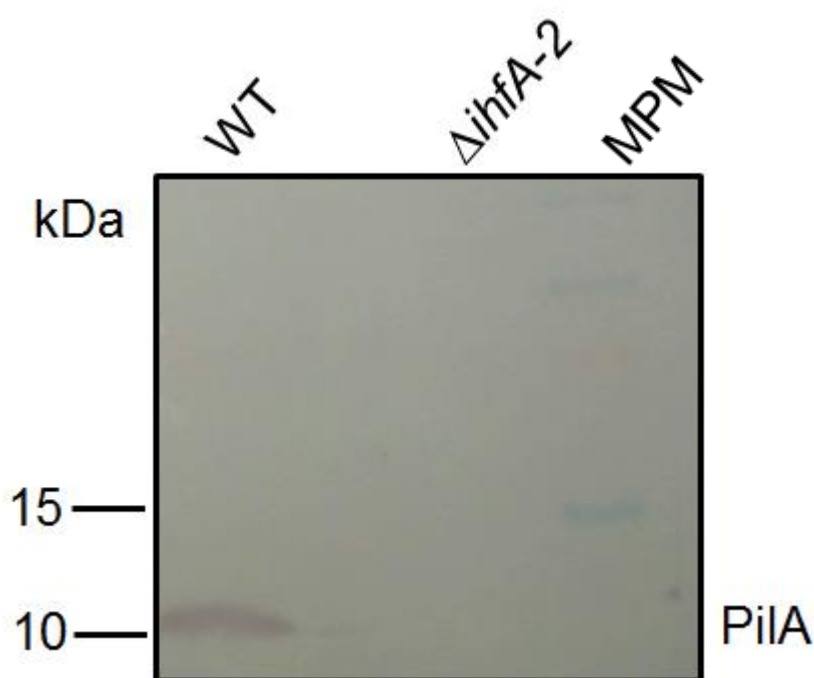


Figura 34. Inmunodetección de PilA en *G. sulfurreducens* DL-1 y su mutante derivada $\Delta ihfA-2$. WT, cepa silvestre. MPM, marcador de peso molecular. Se muestra la posición de la proteína PilA.

Como se muestra en la Figura 34, la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* muestra un fenotipo alterado en cuanto a la producción de pili, puesto que presenta una drástica disminución en la producción de la proteína estructural PilA. Con lo anterior, se pone de manifiesto que el producto del gen *ihfA-2* controla la transcripción del gen *pilA*, y por tanto, se demuestra finalmente que el complejo heterodimérico IHF está regulando de manera positiva la expresión de este gen a nivel transcripcional, concluyendo de esta forma el modelo presentado en la Figura 13.

CONCLUSIONES

- Se logró construir una cepa mutante para el gen *ihfA-2* en *Geobacter sulfurreducens* utilizando el sistema pK18mobsacB, un vector implementado recientemente en esta bacteria que permite realizar mutaciones sitio específicas sin la necesidad de utilizar casetes de resistencia a antibióticos, lo cual frecuentemente genera mutantes polares y limita la utilización de diferentes marcadores de selección.
- La cepa mutante $\Delta ihfA-2$ presenta una deficiencia en cuanto a su capacidad de crecer en medio con fumarato como aceptor final de electrones, comparada con la cepa silvestre, por lo que se sugiere que la proteína Ihf α -2, como parte del complejo IHF, regula positivamente la expresión de proteínas importantes en el transporte de fumarato (tal como el transportador DcuB), y/o enzimas involucradas directamente en su reducción (por ejemplo, el operón fumarato reductasa).
- El producto del gen *ihfA-2* controla la reducción extracelular de metales a través de regular la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en la transferencia de electrones, como son *pilA* y los genes que codifican para los citocromos tipo-c OmcC, OmcB, OmcZ y OmcS. Así mismo, la proteína Ihf α -2 podría estar controlando la transcripción de genes de metabolismo central importantes para el crecimiento de esta bacteria.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la transferencia extracelular de electrones en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* en medio Iron Gel, realizando una cinética de reducción de Fe(III) insoluble.
- Identificar los genes que son regulados por la proteína IhfA-2 a través de un estudio de transcriptoma tipo RNA-Seq.
- Validar los estudios de RNA-Seq mediante RTq-PCR, determinando la expresión relativa de genes importantes en los procesos de transferencia extracelular de electrones y metabolismo central, tanto en la cepa $\Delta ihfA-2$ como en la cepa silvestre.
- Clonar y expresar el complejo IhfA-2/IhfB-1/IhfB-2 con la finalidad de llevar a cabo experimentos de interacción ADN-proteína, para determinar la regulación del complejo IHF sobre sus genes blanco.
- Estudiar la transcripción de genes de metabolismo de acetato/fumarato en la cepa mutante $\Delta ihfA-2$ de *G. sulfurreducens* mediante RTq-PCR.
- Llevar a cabo una cinética de crecimiento de la cepa $\Delta ihfA-2$ en medio de citrato férrico suplementado con fumarato.

BIBLIOGRAFÍA

- Akob DM, Mills HJ, Gihring TM, Kerkhof L, Stucki JW, Anastacio AS, Chin KJ, Kusel K, Palumbo AV, Watson DB, Kostka JE. 2008. Functional diversity and electron donor dependence of microbial populations capable of U(VI) reduction in radionuclide-contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(10):3159-70.
- Andrade A, Hernández-Eligio A, Olvera M, Morett E, Juárez K. The IHF global regulator controls the electron transfers in *Geobacter sulfurreducens*. In preparation.
- Bonanni PS, Schrott GD, Busalmen JP. 2012. A long way to the electrode: how do *Geobacter* cells transport their electrons? *Biochem. Soc. Trans.* 40(6):1274-9.
- Bretl DJ, Demetriadou C, Zahrt TC. 2011. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. 75(4):566-82.
- Brodie EL, Desantis TZ, Joyner DC, Baek SM, Larsen JT, Andersen GL, Hazen TC, Richardson PM, Herman DJ, Tokunaga TK, Wan JM, Firestone MK. 2006. Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9):6288-98.
- Browning DF, Busby SJ. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol.* 2(1):57-65.
- Browning DF, Cole JA, Busby S. 2009. Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli nir* operon promoter. *J. Bacteriol.* 190(21):7258-67.
- Browning DF, Grainger DC, Busby S. 2010. Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 13(6):773-80.
- Brutinel ED, Gralnick JA. 2012. Shuttling happens: soluble flavin mediators of extracellular electron transfer in *Shewanella*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(1):41-8.
- Buck M, Miller S, Drummond M, Dixon R. 1986. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature (London).* 320, 374-378.
- Bush M, Dixon R. 2012. The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ^{54} -Dependent Transcription. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(3):497-529.
- Butler JE, Glaven RH, Esteve-Núñez A, Núñez C, Shelobolina ES, Bond DR, Lovley DR. 2006. Genetic characterization of a single bifunctional enzyme for fumarate reduction and succinate oxidation in *Geobacter sulfurreducens* and engineering of fumarate reduction in *Geobacter metallireducens*. *J Bacteriol.* 188(2):450-5.
- Butler JE, Kaufmann F, Coppi MV, Nunez C, Lovley DR. 2004. MacA, a diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 186(12):4042-5.
- Butler JE, Young ND, Lovley DR. 2009. Evolution from a respiratory ancestor to fill syntrophic and fermentative niches: comparative genomics of six *Geobacteraceae* species. *BMC Genomics.* 10:103.
- Butler JE, Young ND, Lovley DR. 2010. Evolution of electron transfer out of the cell: comparative genomics of six *Geobacter* genomes. *BMC Genomics.* 11:40.

- Caccavo F Jr, Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, Mcinerney MJ. 1994. *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen and acetate oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10):3752-9.
- Cannon WV, Gallegos MT, Buck M. 2000. Isomerization of a binary sigma-promoter DNA complex by transcription activators. *Nat Struct Biol.* 7(7):594-601.
- Cannon WV, Kreutzer R, Kent HM, Morett E, Buck M. 1990. Activation of the *Klebsiella pneumoniae nifU* promoter: multiple and overlapping upstream NifA binding sites and involvement of integration host factor. *Nucleic Acids Res.* 18(7):1693-701.
- Chan CH, Levar CE, Zacharoff L, Badalamenti JP, Bond DR. 2015. Scarless Genome Editing and Stable Inducible Expression Vectors for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol.* 81(20):7178-86.
- Chandler DP, Kukhtin A, Mokhiber R, Knickerbocker C, Ogles D, Rudy G, Golova J, Long P, Peacock A. 2010. Monitoring microbial community structure and dynamics during in situ U(VI) bioremediation with a field-portable microarray analysis system. *Environ. Sci. Technol.* 44(14):5516-22.
- Chang YJ, Long PE, Geyer R, Peacock AD, Resch CT, Sublette K, Pfiffner S, Smithgall A, Anderson RT, Vrionis HA, Stephen JR, Dayvault R, Ortiz-Bernad I, Lovley DR, White DC. 2005. Microbial incorporation of ¹³C-labeled acetate at the field scale: detection of microbes responsible for reduction of U(VI). *Environ. Sci. Technol.* 39(23):9039-48.
- Childers SE, Ciufo S, Lovley DR. 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature.* 416(6882):767-9.
- Coates JD, Ellis DJ, Blunt-Harris EL, Gaw CV, Roden EE, Lovley DR. 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4):1504-9.
- Collado-Vides J, Magasanik B, Gralla, JD. 1991. Control Site Location and Transcriptional Regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55(3):371-94.
- Coppi MV, Leang C, Sandler SJ, Lovley DR. 2001. Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7):3180-7.
- Craig N, Nash HA. 1984. *E. coli* Integration Host Binds to Specific Sites in DNA. *Cell.* 39(3 Pt 2):707-16.
- Debarbuille M, Verstraete IM, Kunst F, Rapaport G. 1991b. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of σ^{54} from Gram-negative bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(20):9092-6.
- Debarbuille M, Verstraete IM, Klier A, Rapoport G. 1991a. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54 and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(6):2212-6.
- Ding YH, Hixson KK, Akujkar MA, Lipton MS, Smith RD, Lovley DR, Mester T. 2008. Proteome of *Geobacter sulfurreducens* grown with Fe(III) oxide or Fe(III) citrate as the electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784(12):1935-41.
- Egger LA, Park H, Inouye M. 1997. Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells.* (3):167-84.
- Feliciano GT, da Silva A, Reguera G, Artacho E. 2012. Molecular and Electronic Structure of the Peptide Subunit of *Geobacter sulfurreducens* Conductive Pili from First Principles. *J. Phys. Chem. A.* 116(30):8023-30.

- Fiévet A, Cascales E, Valette O, Dolla A, Aubert C. 2014. IHF is required for the transcriptional regulation of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough *orp* operons. *PLoS One*. 9(1):e86507.
- Freundlich M, Ramani N, Mathew E, Sirko A, Tsui P. 1992. The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol microbiol*. (18):2557-63.
- Galperin MY. 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*. 5:35.
- Gaspard S, Vazquez F, Holliger C. 1998. Localization and solubilization of the iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol*. 64(9):3188-94.
- Hernández-Eligio A, Andrade A, Maricela O, Burgos X, Juárez K. 2016b. IHF controla la producción de bioelectricidad en *Geobacter sulfurreducens* a través de regular la biosíntesis del pili. 5° Simposio Internacional de Biotecnología e Ingeniería Ambiental. Buenos Aires, Argentina.
- Hernández-Eligio A, Andrade A, Soto L, Morett E, Juárez K. 2016a. The unphosphorylated form of the PilR two-component system regulates pilA gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Pollut Res*. [Epub ahead of print].
- Hobbs M, Collie ES, Free PD, Livinston SP, Mattick JS. 1993. PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 7(5):669-82.
- Holmes DE, Chaudhuri SK, Nevin KP, Mehta T, Methé BA, Liu A, Ward JE, Woodard TL, Webster J, Lovley DR. 2006. Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol*. 8(10):1805-15.
- Holmes DE, Chavan MA, O'neil R, Adams L, Larrahondo MJ, Liu A, Lovley DR. 2011. Gene expression and function during grown of *Geobacter sulfurreducens* on Fe(III) or Mn(IV) oxides. Manuscript submitted.
- Hoover TR, Santero E, Porter S, Kustu S. 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell*. 63(1):11-22.
- Inoue K, Leang C, Franks AE, Woodard TL, Nevin KP, Lovley DR. 2011. Specific localization of the c-type cytochrome OmcZ at the anode surface in current-producing biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol. Rep*. 3(2):211-7
- Ishihama A. 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*. 54:499-518. Review.
- Ishimoto KS, Lory S. 1989. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(6):1954-7.
- Ishimoto KS, Lory S. 1992. Identification of *pilR*, which encodes a transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* pilin gene. *J Bacteriol*. 174(11):3514-21.
- Juárez K, Kim BC, Nevin K, Olvera L, Reguera G, Lovley DR, Methé BA. 2009. PilR, a transcriptional regulator for pilin and other genes required for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 16(3-4):146-58.
- Karlin S, Brocchieri L, Mrazek J, Kaiser D. 2006. Distinguishing features of δ -proteobacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(30):11352-7.
- Kawashima H, Horii T, Ogawa T, Ogawa H. 1984. Functional domains of *Escherichia coli* recA protein. *Mol. Gen. Genet*. 193(2): 288-292.

- Kehl-Fie TE, Porsch EA, Miller SE, St Geme JW. 2009. Expression of *Kingella kingae* type IV pili is regulated by σ_{54} , PilS, and PilR. *J. Bacteriol.* 191(15):4976-86.
- Kerkhof LJ, Williams KH, Long PE, Mcguinness LR. 2011. Phase preference by active, acetate-utilizing bacteria at the Rifle, CO integrated field research challenge site. *Environ. Sci. Technol.* 45(4):1250-6.
- Kino Y, Nakayama-Imahiji H, Fujita M, Tada A, Yoneda S, Murakami K, Hashimoto M, Hayashi T, Okazaki K, Kuwahara T. 2016. Counterselection employing mutated *pheS* for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. *Anaerobe.* 42:81-88.
- Klimes A, Franks AE, Glaven RH, Tran H, Barrett CL, Qiu Y, Zengler K, Lovley DR. 2010. Production of pilus-like filaments in *Geobacter sulfurreducens* in the absence of the type IV pilin protein PilA. *FEMS Microbiol. Lett.* 310(1):62-8.
- Kobayashi K. 2007. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *M Microbiol.* 66(2):395–409.
- Krushkal J, Juárez K, Barbe JF, Qu Y, Andrade A, Piljic M, Adkins RM, Lovley DR, Ueki T. 2010. Genome-wide survey for PilR recognition sites of the metal-reducing prokaryote *Geobacter sulfurreducens*. *Gene.* 469(1-2):31-44.
- Krushkal J, Leang C, Barbe JF, Qu Y, Yan B, Puljic M, Adkins RM, Lovley DR. 2009. Diversity of promoter elements in a *Geobacter sulfurreducens* mutant adapted to disruption in electron transfer. *Funct. Integr. Genomics.* 9(1):15-25.
- Leang C, Adams LA, Chin KJ, Nevin KP, Methé BA, Webster J, Sharma ML, Lovley DR. 2005. Adaptation to disruption of the electron transfer pathway for Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 187(17):5918-26.
- Leang C, Coppi MV, Lovley DR. 2003. OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* 185(7):2096-103.
- Leang C, Krushkal J, Ueki T, Puljic M, Sun J, Juárez K, Nunez C, Reguera G, Didonato R, Postier B, Adkins RM, Lovley DR. 2009. Genome-wide analysis of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Genomics.* 10:331.
- Leang C, Lovley DR. 2005. Regulation of two highly similar genes, *omcB* and *omcC*, in a 10 kb chromosomal duplication in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology.* 151(Pt 6):1761-7.
- Leang C, Qian X, Mester T, Lovley DR. 2010. Alignment of the c-type cytochrome OmcS along pili of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(12):4080-4.
- Lin WC, Coppi MV, Lovley DR. 2004. *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4):2525-8.
- Liu X, Tremblay PL, Malvankar NS, Nevin KP, Lovley DR, 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(3):1219-24.
- Lloyd JR, Leang C, Hodges Myerson AL, Coppi MV, Cuifo S, Methé B, Sandler SJ, Lovley DR. 2003. Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* 369(Pt 1):153-61.
- Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJ, Gorby YA, Goodwin S. 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of

- coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* 159(4):336-44.
- Lovley DR, Nevin KP. 2011. A shift in the current: new applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22(3):441-8.
 - Lovley DR, Phillips EJ. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472–1480.
 - Lovley DR, Stolz JF, Nord GL, Phillips EJ. 1987. Anaerobic production of magnetite by a dissimilatory iron-reducing microorganism. *Nature.* 330, 252–254.
 - Lovley DR, Ueki T, Zhang T, Malvankar NS, Shrestha PM, Flanagan KA, Aklujkar M, Butler JE, Giloteaux L, Rotaru AE, Holmes DE, Franks AE, Orellana R, Risso C, Nevin KP. 2011. *Geobacter*: The Microbe Electric's Physiology, Ecology, and Practical Applications. *Adv Microb Physiol.* 59:1-100.
 - Lovley DR. 2003. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat. Rev. Microbiol.* 1(1):35-44.
 - Lovley DR. 2006a. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(7):497-508.
 - Lovley DR. 2006b. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(3):327-32.
 - Lovley DR. 2008. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19(6):564-71.
 - Lovley DR. 2011. Live wires: microbial extracellular electron transfer for bioenergy and the bioremediation of energy-related contamination. *Energy Environ. Sci.* 4, 4896–4906.
 - Lovley DR. 2012. Long-range electron transport to Fe (III) oxide via pili with metallic-like conductivity. *Biochem. Soc. Trans.* 40(6):1186-90.
 - Ma L, Sundlass NK, Raines RT, Cui Q. 2011. Disruption and formation of surface salt bridges are coupled to DNA binding by the integration host factor: a computational analysis. *Biochemistry.* 50(2):266-75.
 - Ma S, Selvaraj U, Ohman DE, Quarless R, Hassett DJ, Wozniak DJ. 1998. Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 180(4):956–968.
 - Mahadevan R, Palsson BØ, Lovley DR. 2011. In situ to in silico and back: elucidating the physiology and ecology of *Geobacter spp.* using genome-scale modelling. *Nat Rev Microbiol.* 9(1):39-50.
 - Mahadevan R, Yan B, Postier B, Nevin KP, Woodard TL, O'Neil R, Coppi MV, Methé BA, Krushkal J. 2008. Characterizing regulation of metabolism in *Geobacter sulfurreducens* through genome-wide expression data and sequence analysis. *OMICS.* 12(1):33-59.
 - Malvankar NS, Lovley DR. 2012. Microbial Nanowires: A new Paradigm for Biological Electron Transfer and Bioelectronics. *ChemSusChem.* 5(6):1039-46.
 - Malvankar NS, Vargas M, Nevin K, Tremblay PL, Evans-Lutterodt K, Nykypanchuk D, Martz E, Tuominen MT, Lovley DR. 2015. Structural basis for metallic-like conductivity in microbial nanowires. *MBio.* 6(2):e00084.
 - Malvankar NS, Vargas M, Nevin KP, Franks AE, Leang C, Kim BC, Inoue K, Mester T, Covalla SF, Johnson JP, Rotello VM, Tuominen M, Lovley DR. 2011. Tunable

- metallic-like conductivity in microbial nanowires networks. *Nat. Nanotechnol.* 6(9):573-9.
- Mehta T, Coppi MV, Childers SE, Lovley DR. 2005. Outer membrane c-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):8634-41.
 - Méndez-Lorenzo L, Porrás-Domínguez JR, Raga-Carbajal E, Olvera C, Rodríguez-Alegría ME, Carrillo-Nava E, Costas M, López-Munguía A. 2015. Intrinsic Levanase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (*SacB*). *PLoS One.* 10(11):e0143394.
 - Methé BA, Nelson KE, Eisen JA, Paulsen IT, Nelson W, Heidelberg JF, Wu D, Wu M, Ward N, Beanan MJ, Dodson RJ, Madupu R, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Sullivan SA, Haft DH, Selengut J, Davidsen TM, Zafar N, White O, Tran B, Romero C, Forberger HA, Weidman J, Khouri H, Feldblyum TV, Utterback TR, Van Aken SE, Lovley DR, Fraser CM. 2003. Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science.* 302(5652):1967-9.
 - Mitrophanov AY, Groisman EA. 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 22(19):2601-11.
 - Morett E, Segovia L. 1993. The σ^{54} Bacterial Enhancer-Binding Protein Family: Mechanism of Action and Phylogenetic Relationship of Their Functional Domains. *J. BACTERIOL.* 175(19):6067-74.
 - Nash HA, Granston AE. 1991. Similarity Between the DNA-Binding Domains of IHF Protein and TFIIID Protein. *Cell.* 67(6):1037-8.
 - Nevin KP, Kim BC, Glaven RH, Johnson JP, Woodard TL, Methé BA, Didonato RJ, Covalla SF, Franks AE, Liu A, Lovley DR. 2009. Anode biofilm transcriptomics reveals outer surface components essential for high density current production in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *PLoS One.* 4(5):e5628.
 - Nevin KP, Lovley DR. 2000. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5):2248-51.
 - Nevin KP, Richter H, Covalla SF, Johnson JP, Woodard TL, Orloff AL, Jia H, Zhang M, Lovley DR. 2008. Power output and coulombic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells. *Environ. Microbiol.* 10(10):2505-14.
 - Qian X, Mester T, Morgado L, Arakawa T, Sharma ML, Inoue K, Joseph C, Salgueiro CA, Maroney MJ, Lovley DR. 2011. Biochemical characterization of purified OmcS, a c-type cytochrome required for insoluble Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807(4):404-12.
 - Qian X, Reguera G, Mester T, Lovley DR. 2007. Evidence that OmcB and OmpB of *Geobacter sulfurreducens* are outer membrane surface proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 277(1):21-7.
 - Reardon PN, Mueller KT. 2013. Structure of the type IVa major pilin from the electrically conductive bacterial nanowires of *Geobacter sulfurreducens*. *J Biol Chem.* 288(41): 29260-6.
 - Reguera G, McCarthy KD, Mehta T, Nicoll JS, Tuominen MT, Lovley DR. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature.* 435(7045):1098-101.
 - Seeliger S, Cord-Ruwisch R, Schink B. 1998. A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an

- electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J. Bacteriol.* 180(14):3686-91.
- Shelobolina ES, Coppi MV, Korenevsky AA, Didonato LN, Sullivan SA, Konishi H, Xu H, Leang C, Butler JE, Kim BC, Lovley DR. 2007a. Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* 7:16.
 - Shelobolina ES, Nevin KP, Blakeney-Hayward JD, Johnsen CV, Plaia TW, Krader P, Woodard T, Holmes DE, Vanpraagh CG, Lovley DR. 2007b. *Geobacter pickeringii* sp. nov., *Geobacter argillaceus* sp. nov. and *Pelosinus fermentans* gen. nov., sp. nov., isolated from subsurface kaolin lenses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(Pt 1):126-35.
 - Shi L, Squier TC, Zachara JM, Fredrickson JK. 2007. Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multihem c-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* 65(1):12-20.
 - Shingler V. 2011. Signal sensory systems that impact σ^{54} -dependent transcription. *FEMS Microbiol Rev.* 35(3):425-40.
 - Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Biotechnol.* 1:784–791.
 - Snider RM, Strycharz-Glaven SM, Tsoi SD, Erickson JS, Tender LM. 2012. Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(38):15467-72.
 - Soto L. 2013. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN DEL SISTEMA DE DOS COMPONENTES PilS-PilR de *Geobacter sulfurreducens*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos. 3 p.
 - Stonehouse E, Kovacicova G, Taylor RK, Skorupski K. 2008. Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 190(13):4736-48.
 - Su W, Porter S, Kustu S, Echols H. 1990. DNA looping and enhancer activity: association between DNA-bound NTRC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(14):5504-8.
 - Wigneshweraraj S, Bose D, Burrows PC, Joly N, Schumacher J, Rappas M, Pape T, Zhang X, Stockley P, Severinov K, Buck M. 2008. Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol Microbiol.* 68(3):538-46.
 - Wu SS, Kaiser D. 1997. Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 179(24):7748-58.
 - Xiao K, Malvankar NS, Shu C, Martz E, Lovley DR, Sun X. 2016. Low Energy Atomic Models Suggesting a Pilus Structure that could Account for Electrical Conductivity of *Geobacter sulfurreducens* Pili. *Sci. Rep.* 6:23385.
 - Yi H, Nevin KP, Kim BC, Franks AE, Klimes A, Tender LM, Lovley DR. 2009. Selection of a variant of *Geobacter sulfurreducens* with enhanced capacity for current production in microbial fuel cells. *Biosens. Bioelectron.* 24(12):3498-503.
 - Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JC, Römling U. 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 77(3):771–786.
 - Zapf J, Madhusudan M, Grimshaw CE, Hoch JA, Varughese KI, Whiteley JM. 1988. A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site. *Biochemistry.* 37(21):7725-32.

APÉNDICES

V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias

El presente trabajo fue sometido al V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. (SMB) en las fechas 1-5 de Octubre de 2017. Se anexa el resumen a continuación.



SMB Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.
Promover el progreso y educación de la Bioquímica en México

V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias

Comité Organizador:
Otto Geiger
Dimitris Georgellis
Herminia Loza Tavera
Fernando Navarro

1-5 de Octubre de 2017
Hotel Misión Grand Ex-Hacienda
de Chautla, Puebla.

bacterias@smb.org.mx
www.smb.org.mx

Ihf α -2 is part of the IHF complex that controls the transcription of relevant genes involved in electron transfer in *Geobacter sulfurreducens*

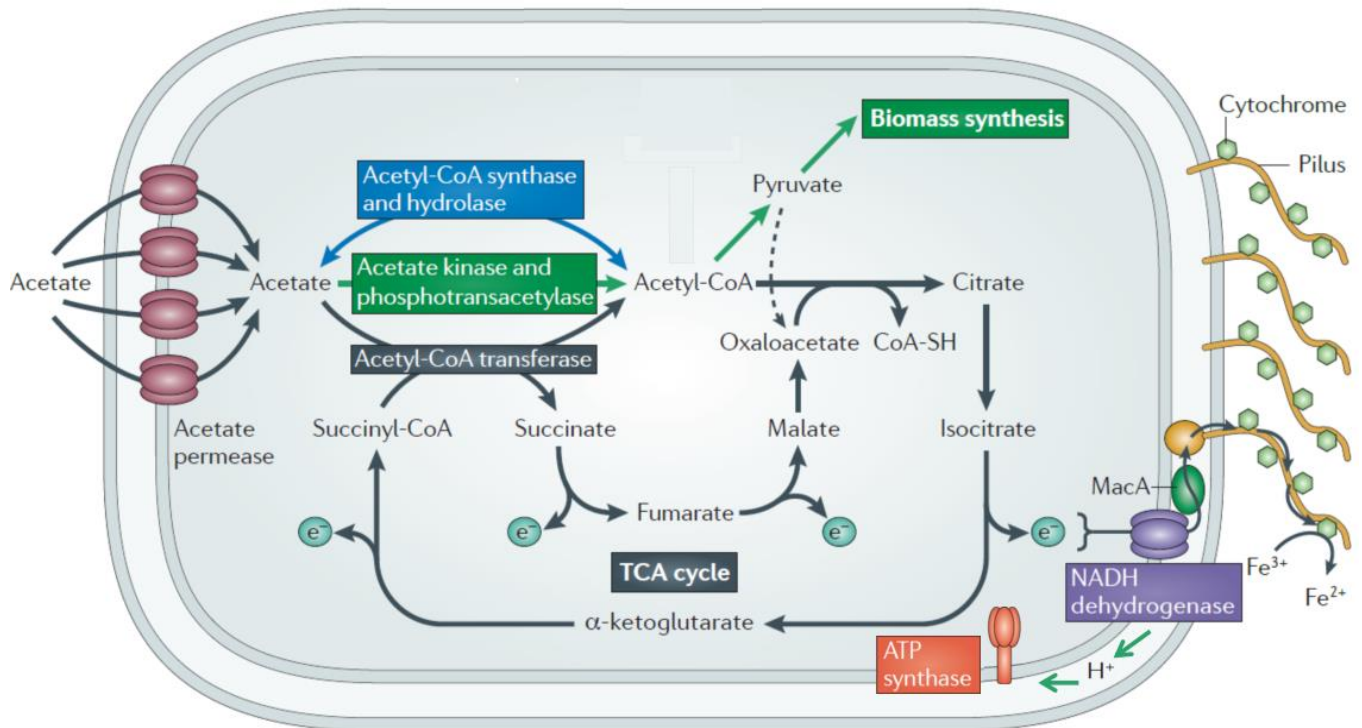
Jesús Manuel Huerta-Amparán, José Alberto Hernández-Eligio*, Katy Juárez López.
*CONACYT, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. katy@ibt.unam.mx

In *G. sulfurreducens*, metal reduction and bioelectricity production require the participation of several elements, including multiple *c*-type cytochromes and electrically conductive pili. The pilus is composed of PilA monomers (*pilA* gene) and their expression depends mainly of the σ^{54} factor and PilR an Enhancer Binding Protein regulator¹. In general, EBP regulators require of IHF complex (α - β heterodimer) to completely activate the transcription of their target gene. *G. sulfurreducens* has 2 genes coding for the α subunit (*ihf α -1* and *ihf α -2*) and 2 for the β subunit (*ihf β -1* and *ihf β -2*). Experimental evidence demonstrates that mutant strains in the subunits of the IHF complex in *G. sulfurreducens*, *ihf α -1*, *ihf β -1* and *ihf β -2* presented a deficient phenotype in growth and Fe(III) reduction, as well as alterations in the expression of the *pilA* and some *c*-type cytochromes important in metal reduction². In this work, we study the role of Ihf α -2 in controls the expression of the genes involved in electron transfer. We construct the Δ *ihf α -2* mutant strain of *G. sulfurreducens* using the pK18mobsacB system. The strain Δ *ihf α -2* showed a drastic deficiency in growth and reduction of soluble Fe(III). Furthermore, this mutant did not produce PILA and it is deficient in production of some *c*-type cytochromes, mainly those located in the outer membrane. Recently, a transcriptome analysis by RNA-seq of the *ihf* mutant strains, resulting in several differentially expressed genes in each mutant, suggesting that although *G. sulfurreducens* contains 2 copies for each subunit, each heterodimer can regulate specific genes and processes. Also, these results demonstrate that the IhfA-2 protein is part of the IHF complex, which positively regulates the transcription of the *pilA* gene, several genes coding for *c*-type cytochromes, and possibly several important enzymes for bacterial growth.

1. Hernández-Eligio et al. The un-phosphorylated form of the PilR two-component system regulates *pilA* gene expression in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Pollut Res*. February 2016.

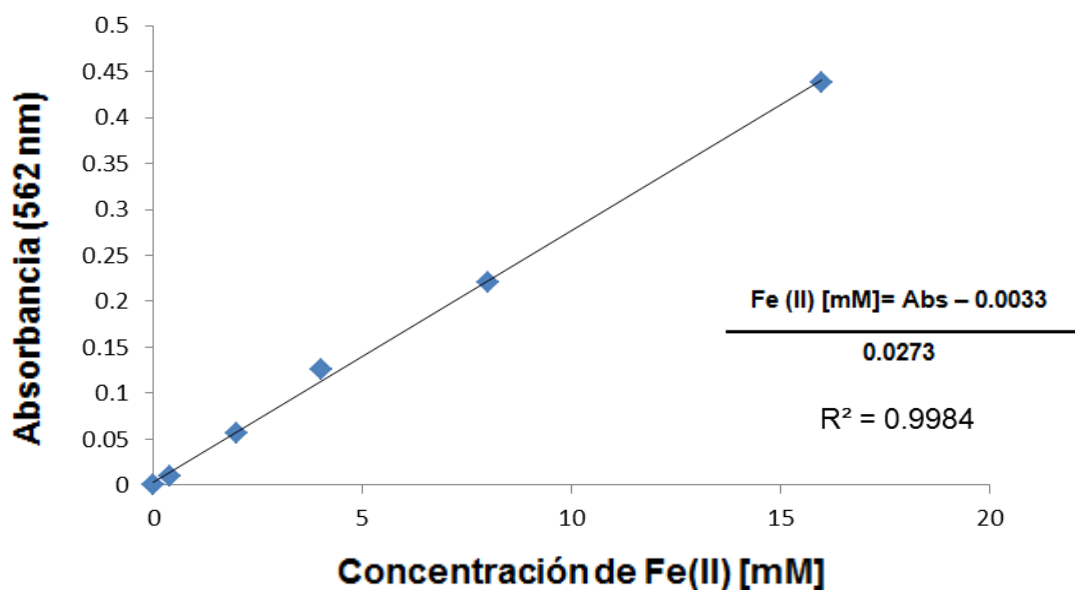
2. Hernández-Eligio José A., Andrade Ángel, Olvera Maricela y Juárez López Katy (2016). IHF controla la producción de bioelectricidad en *Geobacter sulfurreducens* a través de controlar la biosíntesis del pili. In: Candal, R.; Dominguez-Montero, L.; Macarie, K.; Poggi-Varaldo, H.; Vázquez, S., Sastre, I. (Editors): Book of Abstracts Environmental Biotechnology and Engineering-2016, pag. 13. Ed. Cinvestav, México D. F., México.

Metabolismo Central de *Geobacter sulfurreducens* Basado en el Consumo de Acetato



En el género *Geobacter*, existen cuatro transportadores de acetato y tres vías de activación del mismo, conectadas al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La molécula de acetil-CoA utilizada para la síntesis de biomasa es obtenida a través de la vía de la acetato cinasa (flechas verdes), mientras que la acetil-CoA que es sintetizada mediante la reacción producida por la acetil-CoA transferasa es consumida en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (flechas grises). En contraste, la acetil-CoA hidrolasa (flechas azules) está presente solo en *G. metallireducens*. Los electrones, generados durante la oxidación del acetato, son transportados extracelularmente a través de distintos mecanismos, tales como citocromos tipo-c y el pili. (Modificada de Mahadevan y col., 2011).

Curva de Calibración y Ecuación Utilizada para la Determinación de Fe(II)



Preparación de Geles de Poliacrilamida para Electroforesis de Proteínas (SDS-PAGE)

Mezcla para gel de acrilamida al 15%

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O	1.1 mL	1.4 mL
Mezcla acrilamida 30% - bisacrilamida 1%	2.5 mL	0.33 mL
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3 mL	-
Tris 1 M (pH 6.8)	-	0.25 mL
SDS 10%	0.05 mL	0.02 mL
Persulfato de amonio 10%	0.05 mL	0.02 mL
TEMED	0.002 mL	0.002 mL
Volumen final	5 mL	2 mL

***TEMED**: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.