



Caracterización funcional del sistema de dos componentes PilS/PilR, involucrado en la formación de biofilm y producción de bioelectricidad en *Geobacter sulfurreducens*

Hernández-Eligio José Alberto, Andrade Angel, Soto Lizeth, Morett Enrique y Juárez López Katy. Departamento de Bioingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos, México. C. P. 62210. alherel@ibt.unam.mx

Palabras clave: pili, bioelectricidad, PilS/PilR.

Introducción. *Geobacter sulfurreducens* es una bacteria que puede acoplar su respiración anaerobia a la reducción de metales pesados (1); también, en una celda de combustible microbiana, puede oxidar compuestos orgánicos y transferir sus electrones resultantes a electrodos, generando bioelectricidad (2). En *G. sulfurreducens*, la transferencia de electrones es dirigida principalmente por una estructura tipo nanocable llamada pili y diversos citocromos tipo-c. El pili está constituido principalmente por la proteína pilina, la cual está codificada por el gen *pilA* y su expresión depende del regulador de respuesta PilR (miembro del sistema de dos componentes TCS PilS/PilR) y el factor σ^{54} (3, 4). En este trabajo caracterizamos funcionalmente el sistema de dos componentes PilS/PilR y estudiamos su mecanismo de regulación sobre el gen *pilA*.

Metodología. Los genes *pilS* y *pilR* se clonaron y expresaron en sistemas heterólogos para purificar sus proteínas. Adicionalmente, a nivel de ADN se introdujeron las mutaciones puntuales *pilS*_{H334A} y *pilR*_{D53N}. Con las proteínas PilS, PilS_{H334A}, PilR y PilR_{D53N}, se hicieron experimentos in vitro de autofosforilación y fosfotransferencia. Se construyeron las fusiones transcricionales *PpilA::luxCDABE* y con las proteínas PilR y PilR_{D53N} expresadas in cis, se analizó su nivel de activación. Finalmente, se usaron experimentos de interacción DNA-proteína (EMSA) para estudiar la unión de PilR a la región promotora de *pilA*.

Resultados. Se demostró que la proteína PilS se autofosforila con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$; sin embargo, su mutante PilS_{H334A} no se puede autofosforilar. La proteína PilS fosforilada, transfiere su fosfato a la proteína PilR, pero no puede hacerlo a la proteína PilR_{D53N} (Fig. 1).

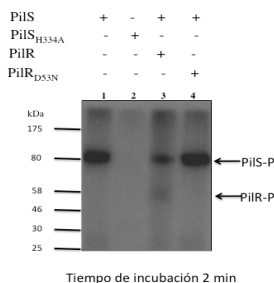


Fig. 1. Autorradiografía de las reacciones de autofosforilación y fosfotransferencia. Línea 1: PilS autofosforilada, línea 2: PilS_{H334A} no fosforilada, línea 3: Fosfotransferencia de PilS a PilR, línea 4: PilS autofosforilada no puede fosforilar a PilR_{D53N}.

De manera interesante, encontramos que las proteínas PilR y PilR_{D53N} activan las fusiones *PpilA::luxCDABE*; sin embargo, PilR_{D53N} activa más fuerte que la proteína PilR. También, los datos muestran que se requiere de una región específica en la región promotora de *pilA* para la completa activación dependiente de PilR (Fig. 2).

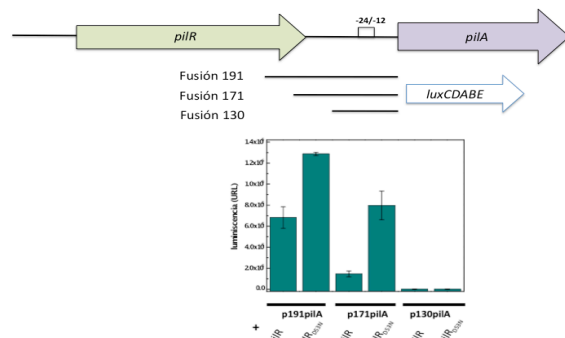


Fig. 2. Activación de las fusiones transcricionales *PpilA::luxCDABE*. En la parte superior se esquematiza las regiones usadas en las fusiones.

Por último, con los experimentos EMSA encontramos que PilR se une in vitro, específicamente a un fragmento de ADN dentro de la región promotora de *pilA*. En este fragmento, se encuentran 2 grupos de secuencias que presentan características de sitios de unión para la proteína PilR y proponemos que son los sitios de unión de PilR.

Conclusiones. 1) PilS es la histidina sensora par del regulador de respuesta PilR. 2) Los residuos H443 y D53 dentro de PilS y PilR (respectivamente) son los sitios de autofosforilación y fosfotransferencia dentro del TCS PilS/PilR. 3) Dado que la proteína PilR_{D53N} no fosforilada, activa las fusiones *PpilA::luxCDABE* más fuerte que la proteína silvestre, sugerimos que la versión no fosforilada de PilR es la que activa la expresión de *pilA*. 4) PilR activa de manera directa la expresión de *pilA* al unirse en su región de regulación.

Agradecimiento. CONACyT-179684.

Bibliografía.

- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward, J.C. (1996). *Nat.* 382, 445-447.
- Lovley DR, Ueki T, Zhang T, Malvankar NS, Shrestha PM, Flanagan KA, Akhujkar M, Butler JE, Giloteaux L, Rotaru AE, Holmes DE, Franks AE, Orellana R, Risso C, Nevin KP. (2011). *Adv Microb Physiol.* 59, 1-100.
- Juárez K, Kim B Ch, Nevin K, Olvera L, Reguera G, Lovley DR, Methé BA. 2009. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 16:146-158.
- Krushkal J, Juárez K, Barbe JF, Qu Y, Andrade A, Piljic M, Adkins RM, Lovley DR, Ueki T. (2010). *Gene.* 469:31-44.