AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a Iñigo Lasa y a Cristina Solano por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y por todo el interés que han puesto para que aprendiera y disfrutara con este trabajo.

En especial me gustaría agradecerle a Maite Echeverz todo el tiempo que ha dedicado en enseñarme siempre con una sonrisa y con paciencia infinita. ¡Gracias jefa!

A Juana Mª Prieto, Juani, mi fiel compañera de batallas con la que he trabajado y compartido muy buenos momentos durante estos meses, y que junto con la jefa ha hecho que este trabajo fuera especial.

Agradecer también al resto de los biofilms por toda la ayuda prestada y el buen ambiente del laboratorio que ha hecho que estos meses de trabajo hayan pasado volando, y por último me gustaría también dar las gracias a Victor que ha estado siempre para ayudarnos en momentos de crisis.

ÍNDICE

RESUMEN 4

ABSTRACT 5

1. INTRODUCCIÓN 6

1.1 Celulosa bacteriana 6

1.2 Síntesis de la celulosa bacteriana 7

1.3 Complejo BcsA-BcsB 9

1.4 El nucleótido cíclico c-di-GMP 10

1.5 Activación de BcsA mediante la unión de c-di-GMP al dominio PilZ 11

1.6 Biofilm de *Salmonella enterica* 13

2. OBJETIVO 15

3. MATERIAL Y MÉTODOS 16

3.1 Cepas bacterianas 16

3.2 Otros organismos 17

3.3 Plásmidos 17

3.4 Oligonucleótidos 19

3.5 Condiciones de crecimiento de las bacterias 19

3.6. Enzimas 20

3.7 Transformación de las bacterias 20

3.8 Purificación y electroforesis de ADN 21

3.9 Subclonaje de la región PilZ de *bcsA* 21

3.10 Mutagénesis al azar del fragmento CD del gen *bcsA* 22

3.11 Construcción del alelo *bcsA* R696A en el cromosoma de la bacteria 23

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26

4.1 Construcción de la cepa testigo 26

3.2 Construcción del plásmido base pUA1108::*bcsA* 28

3.3 Mutagénesis al azar sobre el dominio PilZ de bcsA 28

3.4 Mutagénesis dirigida de bcsA en cromosoma 30

5. CONCLUSIONES 35

BIBLIOGRAFÍA 36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la celulosa. 6

Figura 2. Organización de los operones de la celulosa sintetasa 7

Figura 3. Síntesis de celulosa 8

Figura 4. Arquitectura del complejo proteico BcsA-BcsB 9

Figura 5. Esquema de la síntesis e hidrólisis del c-di-GMP 10

Figura 6. Detalle de BcsA 11

Figura 7. Morfología colonial de *S.* Enteritidis en placas de rojo congo (RC) 14

Figura 8. Plásmidos pWRG100 y pWRG99 18

Figura 9. Plásmido pUA1108:*bcsA*. 22

Figura 10. Descripción de la cepa testigo. 27

Figura 11. Electroforesis de la PCR mutagénica y del pUA1108:*bcsA*. 29

Figura 12. Alineamiento de BcsA de *Rhodobacter sphaeroides y S.Enteritidis.* 31

Figura 13. PCR de chequeo de transformantes ΔXII *bcsA*::clo. 32

Figura 14. Alineamiento de *bcsA* original y *bcsA*_R696A. 33

Figura 15. Colonias en rojo congo de ΔXII PcL rbs *adrA bcsA* R696A complementado 34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Morfología colonial de *Salmonella* en placas de rojo congo. 14

Tabla 2. Cepas bacterianas empleadas en este estudio. 16

Tabla 3. Plásmidos empleados en el trabajo 17

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo de fin de máster. 19

Tabla 5. Condiciones de las PCRs mutagénicas. 23

RESUMEN

La celulosa es uno de los principales componentes de la matriz extracelular de los biofilms formados por algunas especies bacterianas. Los genes involucrados en su síntesis, en el caso de *Salmonella* Enteritidis, se encuentran recogidos en dos operones denominados *bcs*ABZC y *bcs*EFG. De todos estos genes caben destacar *bcsA* y *bcsB*, que forman un complejo interno de membrana que es suficiente para que se produzca la síntesis *in vitro* del polímero. La activación de bcsA para iniciar la síntesis de celulosa requiere la presencia del mensajero secundario c-di-GMP, que activa de forma alostérica a la enzima al interaccionar con su dominio PilZ.

En este estudio se ha planteado producir una celulosa sintetasa capaz de sintetizar celulosa sin necesidad de unir c-di-GMP. Esta nueva enzima permitiría optimizar el proceso de producción de celulosa para aplicaciones industriales y biomédicas. En el estudio hemos utilizado dos aproximaciones, mutaciones aleatorias en el dominio PilZ y mutagénesis dirigida sobre la arginina de la posición 696 de *bcsA*, mutación que durante la realización de este trabajo se ha descrito causa in vitro la activación constitutiva de la celulosa sintetasa de *Rhodobacter sphaeroides*. Las diferentes variantes del gen *bcsA* se han clonado en un plásmido bajo un promotor inducible y su actividad se ha analizado en una cepa de *Salmonella enteritidis* deficiente en c-di-GMP. Los resultados han mostrado que ninguna de las variantes obtenidas por mutación aleatoria han dado lugar a un alelo constitutivamente activo de BcsA y la mutación dirigida en la arginina de la posición 696 provoca la inactivación de la celulosa sintetasa de *Salmonella*.

ABSTRACT

Cellulose is one of the main extracellular matrix components in biofilms produced by bacteria. Genes involved in its synthesis, in *Salmonella* Enteritidis, are clustered in two operons called *bcsABZC* and *bcsEFG*. From these genes it is worth to remark *bcsA and bcsB*, that form an inner membrane complex which is sufficient for the *in vitro* synthesis of the polymer. The presence of the c-di-GMP is necessary for the synthesis because this molecule allosterically activates the cellulose synthase by interacting with the PilZ domain of the BcsA subunit.

The aim of this study has been to generate a cellulose synthase variant able to activate cellulose synthesis in the absence of c-di-GMP. This new enzyme might provide important benefits to optimize the production of cellulose for industrial and biomedical applications. To accomplish this aim, two different approaches have been used: random mutations along PilZ domain of bcsA, and site directed mutagenesis of the arginine at the 696 position of BcsA. This last mutation has been shown to cause *in vitro* the constitutive activation of the cellulose synthase of *Rhodobacter sphaeroides.* Different versions of *bcsA* gene have been cloned into a plasmid under the control of an IPTG-inducible promoter, and have been used to complement a Salmonella strain devoid of c-di-GMP. The results have shown that none of variants obtained by random mutagenesis was active in the absence of c-di-GMP and targeted mutation of the arginine at position 696 renders the cellulose synthase of *Salmonella* inactive.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Celulosa bacteriana

La celulosa es la macromolécula biológica más abundante en la naturaleza (Morgan *et al.*, 2013). Es un polímero lineal formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces 1,4-β glucosídicos, dispuestas en paralelo, que a su vez se unen entre distintas cadenas y dentro de la misma cadena mediante puentes de hidrógeno (Lee *et al.*, 2014) (Fig. 1).

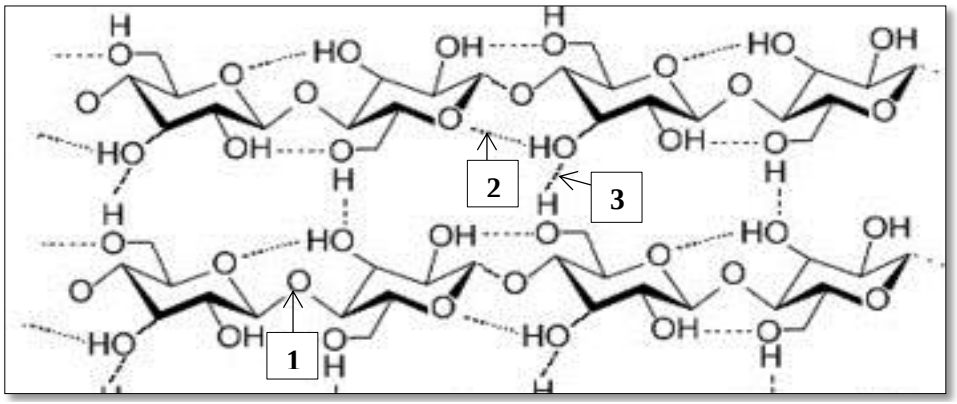

Figura 1. Estructura de la celulosa. 1) Enlace glucosídico; 2) Puente de hidrógeno dentro de la misma cadena; 3)Puente de hidrógeno entre cadenas (http://masbiologia2bct.blogspot.com.es/2010/10/estructura-de-la-celulosa.html).

La mayor parte de la celulosa la generan las plantas vasculares, aunque también es producida por algunas bacterias (Morgan *et al.*, 2013, Omadjela *et al.*, 2013). La celulosa bacteriana es interesante ya que no posee las impurezas que presenta la de origen vegetal tales como hemicelulosa, lignina, pectina y cera. Además la celulosa bacteriana presenta multitud de aplicaciones industriales y biomédicas debido a que es un producto con una alta capacidad de retención de agua y elevada resistencia a la tensión mecánica. Como ejemplos de las aplicaciones biomédicas cabe citar la fabricación de apósitos, membranas acústicas, parches y piel artificial. En el caso de las aplicaciones industriales cabe destacar su uso para la producción de papel de gran calidad, estabilizantes para emulsiones y espumas, y como refuerzo de estructuras finas tales como fibras, espumas poliméricas y matrices de composites. A pesar de que la celulosa bacteriana se produce a una escala relativamente alta, su producción resulta muy cara, por lo que es importante desarrollar nuevos métodos para optimizar su producción y reducir los costes de ésta (Lee *et al.*, 2014).

1.2 Síntesis de la celulosa bacteriana

Los genes necesarios para la síntesis de celulosa en bacterias se denominan *bcs* (*bacterial cellulose synthase*), y se transcriben conjuntamente formando operones (Lee *et al.*, 2014). En el caso de *Salmonella enterica* existen dos operones involucrados en este proceso, *bcs*ABZC y *bcs*EFG (Fig. 2). La mutación de genes en cualquiera de los dos operones inhibe la capacidad de producir celulosa, aunque en el caso del operón *bcs*EFG no está claro el papel que desempeña en la síntesis del polímero (Solano *et al.*, 2002).

Dentro del operón *bcsABZC* caben destacar los genes *bcsA* y *bcsB* que codifican las subunidades BcsA y BcsB forman un complejo proteico de membrana interna y son esenciales para la síntesis de celulosa. La proteína de membrana interna BcsA es la subunidad catalítica del complejo y contiene un dominio glicosil transferasa (GT) entre las hélices transmembrana (TM) 4 y 5. Además, BcsA contiene un dominio PilZ intracelular en su extremo carboxilo-terminal, que se une al nucleótido cíclico c-di-GMP (Amikam & Galperin, 2006). Por otra parte, BcsB es una proteína periplásmica que está anclada a la membrana interna a través de una única hélice transmembrana presente en su extremo carboxilo-terminal (Morgan *et al.*, 2013, Standal *et al.*, 1994).

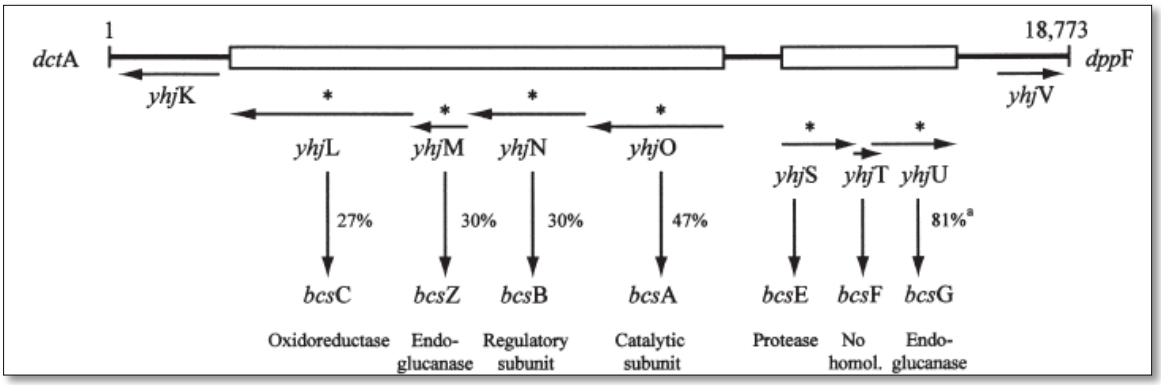

Figura 2. Organización de los operones de la celulosa sintetasa en *Salmonell*a Enteritidis (Solano *et al.*, 2002).

Los polisacáridos extracelulares, como es el caso de la celulosa se sintetizan en el interior de la bacteria a partir de azúcares nucleótidos activados y son transportados a través de la membrana celular durante su síntesis. De este proceso se encargan las glicosiltransferasas (GT). Como se ha comentado anteriormente, BcsA es una GT embebida en la membrana bacteriana, que usa como azúcar nucleótido activado la UDP-Glucosa (UDP-Glc). La polimerización de las moléculas de glucosa vía enlaces β-1,4

glicosídicos es un proceso en tres pasos que depende de la presencia de un catión divalente, que frecuentemente es el magnesio, y que se desencadena por la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de BcsA. En un primer paso, tras la estimulación por el c-di-GMP, la enzima une su sustrato, UDP-Glucosa (UDP-Gluc), en el dominio GT intracelular. En el segundo paso, la UDP-Glc es transferida a un grupo 4´-OH en el extremo terminal no reducido de la cadena del polímero, extendiendo así el polímero y liberando el UDP como producto secundario de la reacción. En el tercer paso, el polímero debe ser translocado al interior del canal transmembrana (TM), para dejar un hueco que permita la adición de una nueva unidad de glucosa en el extremo no reducido del polímero, y además el UDP debe reemplazarse por otra molécula de UDP-Glc en una nueva ronda de catálisis (Morgan *et al.*, 2014).

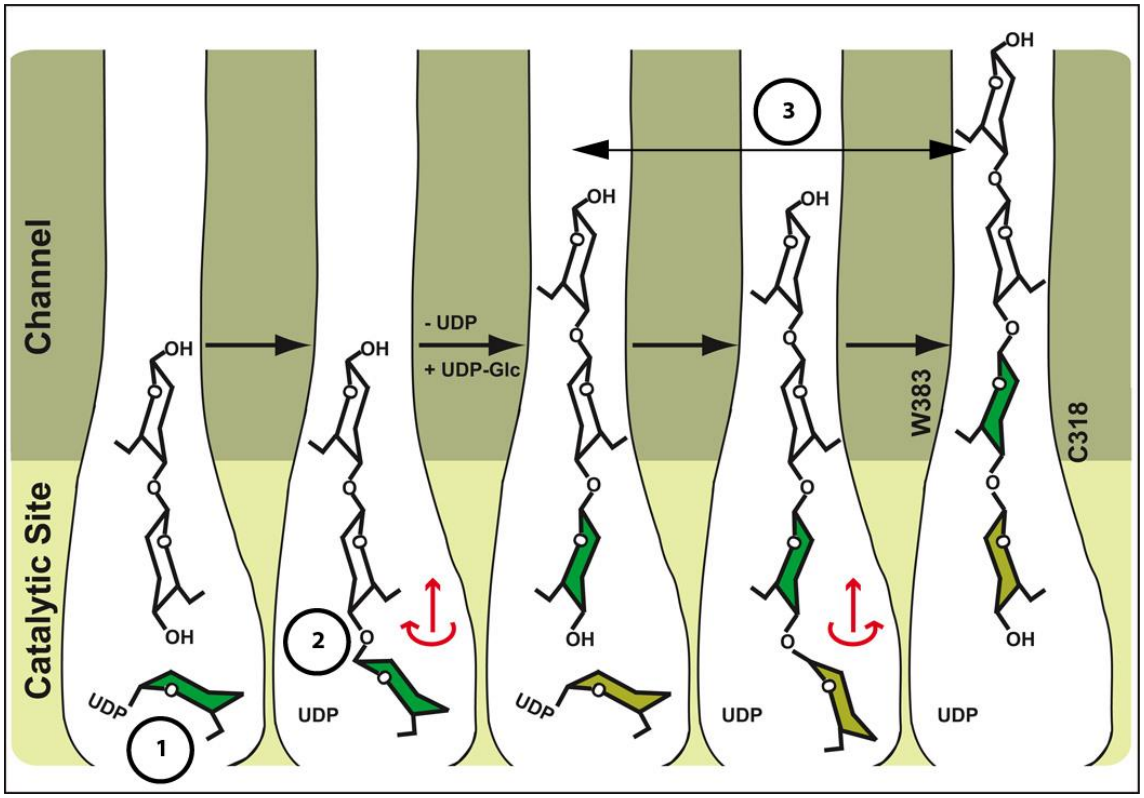

Figura 3. Síntesis de celulosa (Morgan *et al.*, 2013); 1, 2 y 3 señalan los pasos del proceso.

1.3 Complejo BcsA-BcsB

BcsA y BcsB están fusionados en un polipéptido simple, y constituyen el complejo proteico capaz de sintetizar celulosa *in vitro*, con un grado de polimerización de por lo menos 200 unidades de glucosa (Omadjela *et al.*, 2013).

BcsA es una proteína de membrana interna catalíticamente activa que contiene un dominio GT (color beis) y ocho dominios transmembrana, TM1 a TM8 (color verde). Los dominios TM3-8 forman un estrecho canal (canal TM) a través del cual se produce la translocación del polisacárido que se está sintetizando. El extremo C-terminal (color rojo) intracelular de BcsA contiene una estructura *β-barrel* con seis hebras que se une mediante una hélice alfa al dominio GT que también se encuentra en el citoplasma. En cuanto al dominio GT, consiste en una mezcla de siete láminas beta, rodeadas de siete hélices alfa, que se unen a la región transmembrana mediante tres hélices anfipáticas (IF1-3). De estas hélices cabe destacar la IF3 que crea un *loop* (bucle*)* con la TM7 (*IF3-TM7 loop*), que a partir de ahora denominaremos *gating loop*, que se desplaza a lo largo de la entrada al sitio de unión de la UDP-Glc al dominio catalítico GT (Morgan *et al.*, 2013) (Fig. 4). BcsB es una proteína periplásmica, rica en hebras beta que posee forma de cúpula. El extremo N-terminal forma la punta de la cúpula (azul claro) y el C-terminal (azul oscuro) sirve de anclaje transmembrana e interactúa con BcsA (Morgan *et al.*, 2013) (Fig. 4).

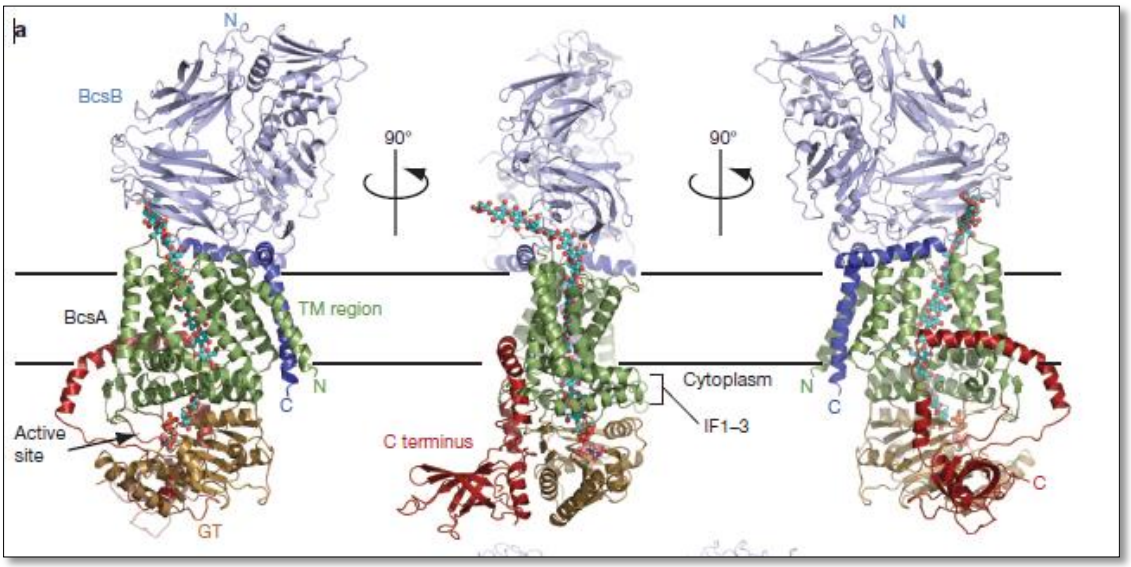

Figura 4. Arquitectura del complejo proteico BcsA-BcsB (Morgan *et al.*, 2013).

1.4 El nucleótido cíclico c-di-GMP

El c-di-GMP (cyclic dimeric GMP) es un importante mensajero secundario bacteriano, que regula numerosos procesos tales como la formación del biofilm, la movilidad, la virulencia, el ciclo celular y la diferenciación entre otros (Romling *et al.*, 2013).

Es reconocido como un mensajero secundario universal porque se han encontrado enzimas de síntesis y degradación de este nucleótido en la mayoría de los *phyla* bacterianos. Las enzimas responsables de la síntesis de c-di-GMP son diguanilato ciclasas (DGC), que poseen dominios GGDEF, y catalizan la formación de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP. Por otra parte, las enzimas responsables de su degradación son fosfodiesterasas específicas (PDE), que poseen dominios EAL o HD-GYP, que permiten la hidrólisis del c-di-GMP en pGpG o GMP, respectivamente (Romling *et al.*, 2013) (Fig. 5).

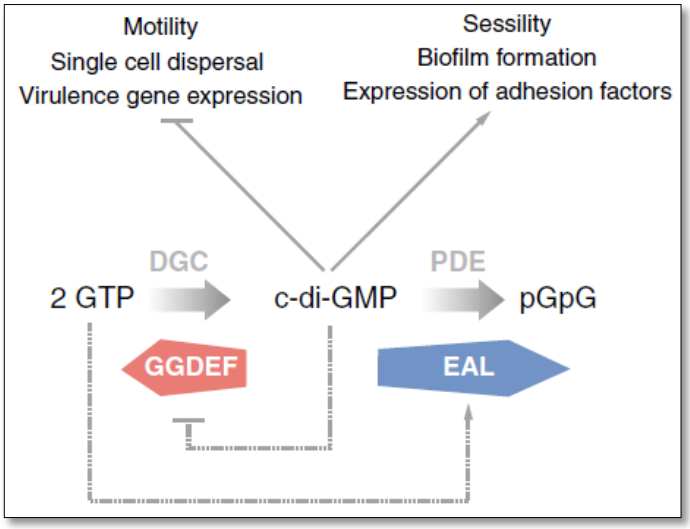

Figura 5. Esquema de la síntesis e hidrólisis del c-di-GMP (Jenal & Malone, 2006).

El número de genes que codifican proteínas con dominios GGDEF y EAL o HD/GYP varían en los distintos genomas bacterianos (Jenal & Malone, 2006). En el caso de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* ser. Enteritidis (a partir de ahora *S.* Enteritidis), el número de proteínas que presentan un dominio GGDEF es de doce. En el laboratorio de biofilms microbianos se ha construido un mutante que carece de los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF y es por lo tanto incapaz de sintetizar c-di-GMP (Solano *et al.*, 2009). Esta cepa proporciona un excelente fondo

genético para analizar *in vivo* la capacidad de la celulosa sintetasa de producir celulosa en ausencia de c-di-GMP.

Como en el caso de *Salmonella,* otras bacterias contienen múltiples enzimas implicadas en la síntesis y degradación de c-di-GMP. Sin embargo el número de receptores de esta molécula no se relaciona con el número de proteínas que la metabolizan (Romling *et al.*, 2013). La primera proteína descrita receptora de c-di-GMP, designada PilZ, fue identificada por Amikam y Galperin (Amikam & Galperin, 2006). La mayoría de las enterobacterias contienen solo dos proteínas con dominios PilZ, que son YcgR y BcsA. La primera de éstas regula la movilidad de la bacteria y la segunda la producción de celulosa, ambas de forma dependiente de la cantidad de c-di-GMP presente en la bacteria (Ryjenkov *et al.*, 2006).

1.5 Activación de BcsA mediante la unión de c-di-GMP al dominio PilZ

El c-di-GMP activa de forma alostérica a la celulosa sintetasa, siendo PilZ el dominio diana del mensajero secundario (Karatan & Watnick, 2009). Este dominio posee dos motivos muy conservados, el RXXXR que se encuentra en la estructura de unión *TM8-β-barrel* y el motivo DXSXXG que se encuentra en la estructura *β-barrel (Amikam & Galperin, 2006)*. El dominio PilZ se extiende desde la TM8 (que está en contacto con el bucle IF3-TM7), pasando por la estructura de seis hebras *β-barrel*, hasta una hélice alfa que contacta con el dominio GT (Morgan *et al.*, 2013).

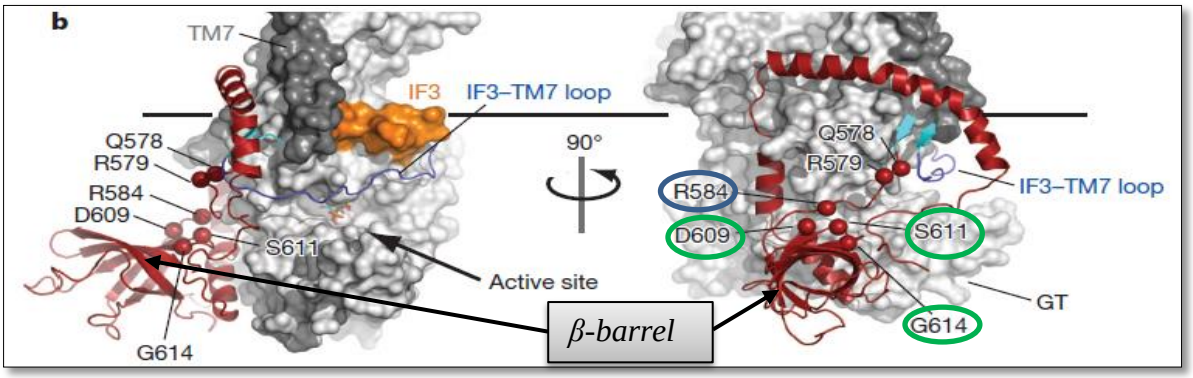

Figura 6. Detalle de BcsA (C-terminal en rojo; TM7 en gris oscuro; IF3 en naranja; *loop* IF3-TM7 en azul oscuro; el *linker* que conecta TM8 con el *β-barrel* forma dos hebras de láminas beta que aparecen representadas en azul claro) (Morgan *et al.*, 2013). La arginina R584, rodeada de azul, corresponde a la última del motivo RXXXR, y los aminoácidos rodeados de verde pertenecen al motivo DXSXXG.

Al comenzar este trabajo de fin de máster (TFM), se creía que los residuos de ambos motivos, interactuaban con el c-di-GMP, y que esta interacción provocaba un cambio conformacional que permitía el acceso de la UDP-Glc al sitio catalítico, cuya entrada estaba bloqueada por el bucle IF3-TM7 (Morgan *et al.*, 2013). Sin embargo durante la realización del presente TFM, el mismo grupo de investigación, dirigido por el Dr. Zimmer (Morgan *et al.*, 2014) ha profundizado en el mecanismo de unión del c-di-GMP a BcsA, lo cual provocó un cambio en el planteamiento del TFM, tal y como se explicará más adelante.

En dicho trabajo Morgan et al. emplearon como modelo de síntesis de celulosa el complejo proteico BcsA-BcsB de *Rhodobacter sphaeroides*. Mediante un análisis estructural del complejo BcsA-BcsB unido a c-di-GMP durante estadíos intermedios de la síntesis de celulosa y su translocación, se observó que el dominio PilZ de BcsA une un dímero intercalado de c-di-GMP. Una molécula del dímero se une al *β-barrel* del motivo DXSXXG mientras que el otro se une al conector *TM8-β-barrel* del motivo RXXXR. En el caso del motivo RXXXR la interacción con el mensajero secundario se da tanto en la región N-terminal del motivo (Arg580) como en la región C-terminal (Arg584) (Morgan *et al.*, 2014).

Durante el "estado de reposo" (en ausencia de c-di-GMP) la Arg580 del dominio PilZ contacta con el Thr511 del C-terminal del *gating loop* quedando éste en frente de la entrada del dominio GT, bloqueando el sitio catalítico de la enzima. Este estado a su vez se estabiliza por la formación de un puente salino entre la Arg580 y el Glu371. Estas condiciones son las que dan lugar al estado autoinhibido de la celulosa sintetasa. La unión del c-di-GMP da paso al "estado abierto", en el que se da un cambio conformacional tras la unión del mensajero, siendo la Arg580 la que gira 180º alejándose del dominio GT para interaccionar con el c-di-GMP y rompiendo sus interacciones con el gating loop y con el Glu371. Además el *gating loop* se estabiliza por interacciones hidrofóbicas con las hélices anfipáticas de interfaz (IF) y forma la entrada del canal TM (Morgan *et al.*, 2014).

Tras conocer el papel fundamental de la arginina 580 en la autoinhibición de la celulosa sintetasa, Morgan et al. realizaron ensayos de síntesis de celulosa *in vitro* con el complejo BcsA-BcsB salvaje o mutante en la Arg580 de BcsA. El cambio de este aminoácido a alanina dio lugar a una proteína BcsA constitutivamente activa, es decir

capaz de sintetizar celulosa *in vitro* incluso en ausencia de c-di-GMP (Morgan *et al.*, 2014).

1.6 Biofilm de *Salmonella enterica*

Un biofilm es una comunidad de microorganismos que crece dentro de una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado y adheridos a una superficie que puede ser tanto inerte como viva. Los componentes más frecuentes de la matriz del biofilm y en muchos casos esenciales para la formación y el mantenimiento del mismo son los exopolisacáridos (Karunakaran *et al.*, 2011). A este respecto, la producción de celulosa bacteriana está frecuentemente relacionada con la formación de biofilms en diversas especies bacterianas. Teniendo en cuenta que el c-di-GMP actúa como un activador alostérico de la síntesis de celulosa, la presencia de altos niveles de c-di-GMP en la bacteria se relacionan con un aumento en la capacidad de formar biofilm (Simm *et al.*, 2004).

S. Enteritidis es un patógeno, que al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, es capaz de formar biofilms (Jonas *et al.*, 2007). *S.* Enteritidis junto con otros serovares pertenecientes a la subespecie *S. enterica* es una de las principales causas de las infecciones alimentarias que se producen en todo el mundo. Uno de los factores que favorecen su amplia distribución es la capacidad que tiene de formar biofilms en distintas superficies tanto bióticas como abióticas, lo que le permite sobrevivir en muy diferentes ambientes (Robijns *et al.*, 2014).

La composición de la matriz extracelular del biofilm formado por *Salmonella* depende de las condiciones del medio de cultivo. Así, en un medio rico, Luria Bertani (LB), la matriz extracelular está formada principalmente por tres componentes diferentes que son las fimbrias agregativas, la celulosa y la proteína de superficie BapA (Latasa *et al.*, 2005). Las fimbrias están implicadas, entre otras cosas, en la adhesión a superficies y en la agregación celular (Jonas *et al.*, 2007). La proteína de superficie BapA (*biofilm-associated protein*) tiene un papel estructural en el desarrollo del biofilm similar al de las fimbrias (Latasa *et al.*, 2005). Por otra parte la celulosa confiere a las bacterias del biofilm resistencia a condiciones ambientales adversas (Solano *et al.*, 2002).

La producción de los distintos elementos de la matriz del biofilm de *Salmonella* se puede visualizar mediante morfología colonial en placas de rojo congo (RC) tras incubación a 28ºC durante 48 horas: rdar (red, dry, and rough: rojo, seco y rugoso), bdar

(brown, dry, and rough: marrón, seco y rugoso), pdar (pink, dry, and rough: rosa, seco y rugoso), y saw (smooth and white: liso y blanco) (Tabla 1; Fig. 7A).

Por otro lado la producción de celulosa se puede visualizar en placas de LB agar conteniendo el fluorocromo calcofluor (CF). Este fluorocromo se une a los enlaces β1-4 de polisacáridos tales como celulosa o chitina (meter referencia Solano et al., 2002). La fluorescencia bajo luz UV de las colonias desarrolladas en este medio indican la síntesis de celulosa (Fig. 7B).

Tabla 1. Morfología colonial de *Salmonella* en placas de rojo congo.

Morfología	Celulosa	Fimbrias agregativas	Características de las colonias
rdar	+	+	Rojas, secas y rugosas
saw	-	-	Blancas y lisas
bdar	-	+	Marrones y lisas
pdar	+	-	Rosas y lisas

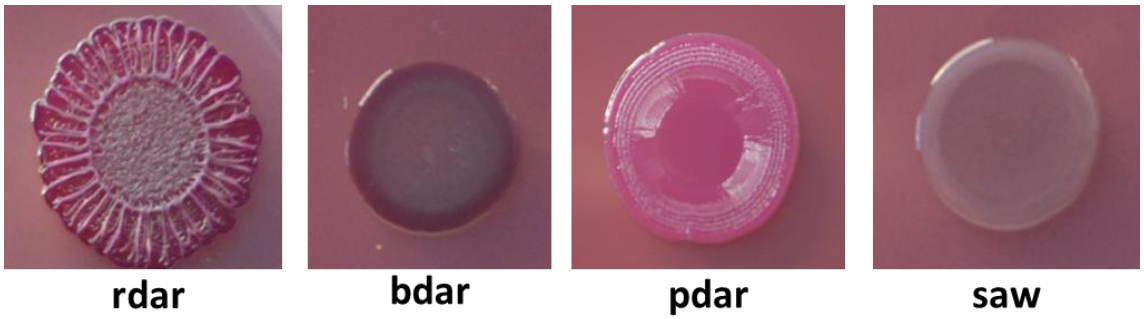

Figura 7. A. Morfología colonial de *S.* Enteritidis en placas de LB agar que contienen rojo congo (RC) B. Morfología colonial de *S.* Enteritidis en placas de LB agar suplementado con calcofluor (CF). La fluorescencia de *S.* Enteritidis es indicativa de la síntesis de celulosa.

2. OBJETIVO

Teniendo en cuenta todo lo anterior, en este trabajo fin de máster, se pretende obtener un alelo de celulosa sintetasa que sea capaz de activar la producción de celulosa *in vivo* en ausencia del activador alostérico c-di-GMP. Para realizar este trabajo contamos con una cepa de Salmonella que es deficiente en la síntesis de c-di-GMP y que nos permite valorar la una forma sencilla si una variante de BcsA es capaz de producir celulosa sin necesidad de unir c-di-GMP.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Las bacterias empleadas en este proyecto fueron del serotipo *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Enteritidis* (*S.* Enteritidis) y se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas empleadas en este estudio.

Cepas	Características relevantes	Fenotipo en placas de RC	Fuente
***S.* Enteritidis**			
WT	Aislado clínico *S.* Enteritidis 3934.	rdar	(Solano *et al.*, 2002)
WT Δ*bcsA*	3934 *bcsA 15_16ins*TAAGTAAGTAAG WT conteniendo el gen *bcsA* mutado mediante la inserción de 3 codones stop, 15 nt después del codón que codifica la metionina inicial.	bdar	Lab. Biofilms Microbianos
WT Δ*bcsA* Δ*csgBA*	3934 *bcsA 15_16ins*TAAGTAAGTAAG Δ*csgBA*::Tc^R WT ΔbcsA y mutante en fimbrias mediante la inserción de un cassette de tetraciclina en *csgBA*.	saw	Lab. Biofilms Microbianos
WT Δ*adrA* Δ*bcsA* Δ*csgBA*	3934 *bcsA 15_16ins*TAAGTAAGTAAG Δ*csgBA*::Tc^R Δ*adrA*::Km^R Mutante en *bcsA ,csgBA y* en el gen *adrA* mediante la inserción de un cassette de kanamicina.	saw	Lab. Biofilms Microbianos
ΔXII	3934 Δ*adrA* Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484* Derivado de cepa 3934, mutante múltiple en los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF. Incapaz de producir c-di-GMP.	bdar	(Solano *et al.*, 2009)
ΔXII Δ*bcsA*	3934 Δ*adrA* Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484 bcsA 15_16ins*TAAGTAAGTAAG ΔXII conteniendo el gen *bcsA* mutado mediante la inserción de 3 codones stop, 15 nt después del codón que codifica la metionina inicial.	bdar	Lab. Biofilms Microbianos
ΔXII Δ*bcsA Δ*csgBA	3934 Δ*adrA* Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484 bcsA 15_16ins*TAAGTAAGTAAG Δ*csgBA*::Tc^R ΔXII ΔbcsA y mutante en fimbrias mediante la inserción de un cassette de tetraciclina en *csgBA*.	saw	Lab. Biofilms Microbianos
ΔXII *bcsA*::clo	3934 Δ*adrA* Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484 bcsA 2088_2089ins*Cm^R ΔXII mutante en *bcsA* mediante la inserción de un cassette de cloranfenicol.	bdar	Este estudio

ΔXII_*bcsA* R696A	3934 Δ*adrA* Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484* *bcsA*_R696A ΔXII que expresa BcsA mutada en la arginina de la posición 696 a alanina.	Resultados ??	Este estudio
WT *PcL rbs adrA*	3934 Δ*adrAinsPcL rbs* Km^R Derivado de ΔXII en el que el gen *adrA* está bajo el control, del cassette *km* PcL *rbs(Da Re et al., 2007),* de manera que se expresa constitutivamente. Esta cepa contiene niveles muy altos, constitutivos, de c-di-GMP.	rdar	Lab. Biofilms Microbianos
ΔXII *PcL rbs adrA bcsA* R696A	3934 Δ*sen1023* Δ*yeaJ* Δ*yciR* Δ*yegE* Δ*yfiN* Δ*yhdA* Δ*sen3222* Δ*yhjK* Δ*sen4316* Δ*yfeA* Δ*sen2484* *bcsA_R696* Δ*adrAinsPcL rbs* Km^R Derivado de ΔXII _*bcsA:*R696A en el que el gen *adrA* está bajo el control, del cassette *km* PcL *rbs(Da Re et al., 2007),* de manera que se expresa constitutivamente. Esta cepa contiene niveles muy altos, constitutivos, de c-di-GMP.	Resultados ??	Este estudio
Escherichia coli			
XL1 Blue	*recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *hsd*R17 *supE*44 *relA*1 *lac*[F´*proAB* $lacI^q$ZΔ*M15* Tn10(Tet^r)]		Stratagene

3.2 Otros organismos

La cepa ΔXII *PcL rbs adrA bcsA* R696A se contruyó mediante transducción desde la cepa WT *PcL rbs adrA* mediante el uso del fago P22 HT105/1 int-201 (Schmieger, 1972).

3.3 Plásmidos

Los plásmidos empleados a lo largo de este trabajo fin de máster se han recogido en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos empleados en el trabajo**.**

Plásmidos	Características relevantes	Fuente o referencia
pJET 1.2	Vector de clonaje comercial amp^r, *eco47IR* (El gen letal eco47IR permite una selección positiva de los transformantes)	Thermo Scientific
pJET 1.2::*bcsA_AD*	pJET 1.2 en el que se ha clonado el gen *bcsA*	Este estudio
pJET::*bcsA_R696A_CD*	pJET en el que se ha clonado el fragmento *bcsA*_CD amplificado a partir de la cepa ΔXII_*bcsA* R696A	Este estudio
pUA1108	Derivado del plásmido pGEX 4T-1 en el que se ha delecionado el gen *gst*; amp^r; promotor P*tac*; gen *lac*I^q Vector para la expresión de genes a través del promotor P*tac*	(Medina-Ruiz *et al.*, 2010).

	inducible por IPTG, siendo el *Ptac* un híbrido de los promotores *trp* y *lac* (de Boer et al., 1983).	
pUA1108:*bcsA_AD*	pUA1108 conteniendo el gen *bcsA* bajo el control del promotor P*tac* (Fig. 9)	Este estudio
pWRG100	Derivado del pKD3. Contiene una secuencia reconocida por I-SceI y un cassette de cloranfenicol (Fig. 8).	(Blank *et al.*, 2011).
pWRG99	Derivado del pKD46 termosensible y con resistencia a ampicilina que contiene el gen que codifica la endonucleasa I-SceI bajo un promotor inducible por anhidro-tetraciclina (AHT) y los genes del sistema de recombinasas λ-Red bajo un promotor inducible por arabinosa (Fig.9).	(Blank *et al.*, 2011).

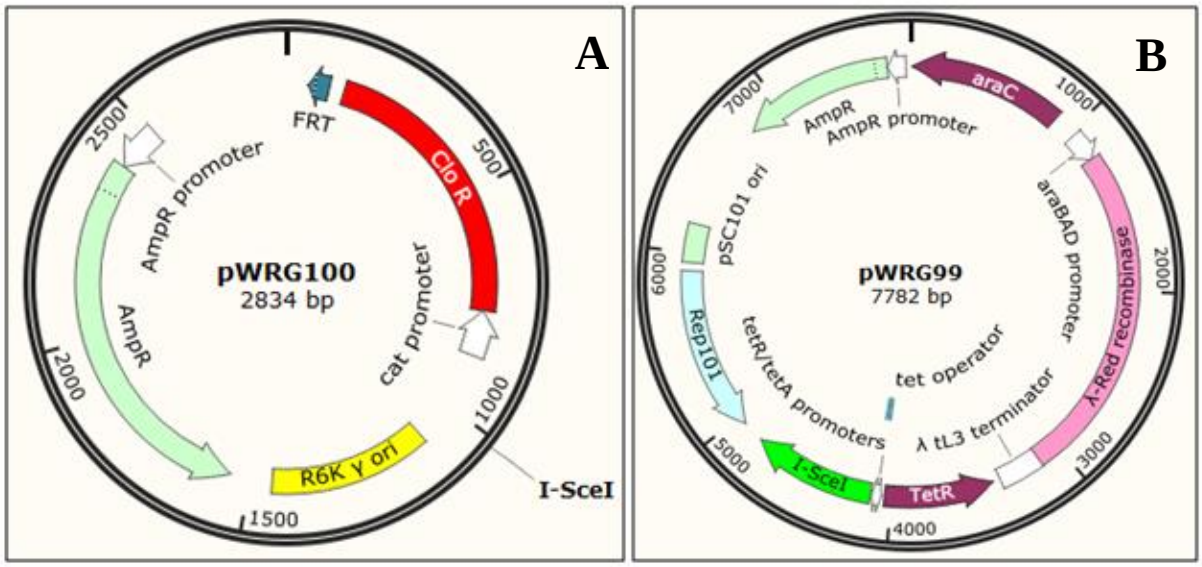

Figura 8. A) Plásmido pWRG100, del que se amplifica el fragmento lineal de ADN que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol y la secuencia diana de la endonucleasa I-SceI (Blank *et al.*, 2011)). **B)** Plásmido pWRG99 que contiene el gen de resistencia a ampicilina, el sistema de recombinación λ-red bajo un promotor inducible por arabinosa, y el gen que codifica I-SceI bajo el promotor TetA/TetR (Blank *et al.*, 2011).

3.4 Oligonucleótidos

Tabla 4. Cebadores empleados en este trabajo de fin de máster.

Oligonucleótidos	Secuencias (5´->3´) (subrayadas la secuencia diana de enzimas de restricción y en negrita los nucleótidos que provocan cambios en la secuencia original de *bcsA)*
Oligonucleótidos mutagénesis *bcsA*	
bcsA NdeI Fw	catatgATGAGCGCCCTTTCCCGGTGG
SpeI NotI bcsA AB Rv	gcggccgctactatatggAC**T**AG**T**GTCGGCGGTGCGATATACCA
SpeI bcsA CD Fw	GGtattgctaat**actagt**cgcgttgatcaatccgca
bcsA NotI Rv	gcggccgcTCATCATTGTTGAGCCTGA
Oligonucleótidos para secuenciar desde derivados del plásmido pUA1108	
pUA1108 sec Fw 2	gccgacatcataacggttc
3´sequencing primer pGEX	ccgggagctgcatgtgtcagagg
Oligonucleótidos mutación BcsA R696A	
bcsA clo R696A Fw	TataacctggtcattctcggcggcgcggttgcggtttcggtagagagtaaacaggtcagaCGCCTTACGCCCCGCCCTGC
bcsA clo R696A Rv	caaatgtccatcttcgcgggcgatggcccccggcatggcaatctcgacccgatgcgcgcg CTAGACTATATTACCCTGTT
Dimer bcsA R696A Fw	ggcgcggttgcggtttcggtagagagtaaacaggtc**GCG**cgcgcgcatcgggtcgagattgccatgccgggggccatcgc
Dimer bcsA R696A Rv	gcgatggcccccggcatggcaatctcgacccgatgcgcgcg**CGC**gacctgtttactctctaccgaaaccgcaaccgcgcc
Oligonucleótidos comprobación inserción *PcL rbs*	
adrA Km PcL rbs FW	CCGAAATTTCATACTTCCTCCATGCGCCCTGTTTCTATAATTTGGGAAAATTGTTTCTAA
adrA PcL sec Rv	ggcggccaccggtaaaaac

3.5 Condiciones de crecimiento de las bacterias

El medio de cultivo general utilizado fue Luria-Bertani (LB) (Pronadisa) al que se añadieron, según las necesidades, agar bacteriológico como agente gelificante (VWR), y diferentes antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (100, 150, 200 o 250 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y anhidrotetraciclina (1000ng/ml) (Sigma (St. Louis, USA)). Para los ensayos de complementación con el plásmido pUA1108 se suplementó el medio con IPTG 0,5 mM (Bioline).

Para determinar el color y la morfología colonial se utilizaron placas de LB Agar sin sal conteniendo el colorante rojo congo (Rojo congo 40 mg/l y Coomassie brilliant blue 20 mg/l) y diferentes antibióticos mencionados anteriormente según las

necesidades (Gerstel & Romling, 2001). Para observar la producción de celulosa también se utilizó LB agar suplementado con calcofluor al 0.625%.

Para la eliminación de fagos en el proceso de transducción se utilizó el medio EBU ((Glucosa (250g/l), K_2HPO_4 (250g/l), Evans blue (6.25g/l), Fluoresceína (12.5g/l), LB (20g/l) y agar (15g/l))(Bochner B., 1984).

3.6. Enzimas

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó de forma rutinaria utilizando la enzima DreamTaq DNA polimerasa de Thermo Scientific. Para la reacción de amplificación del gen *bcsA* y el fragmento *bcsA*_CD R696A que se envió a secuenciar, se utilizó la enzima *Phusion polymerase* de Thermo Scientific. En el caso de la mutagénesis al azar se usó una DNA polimerasa, mezcla entre dos enzimas propensas a cometer errores (Taq DNA polimerasa y Mutazyme I DNA polimerasa).

Las enzimas de restricción utilizadas fueron suministradas por Thermo Scientific y se utilizaron los búferes suministrados por la casa comercial a la concentración recomendada.

Para la ligación de fragmentos de DNA en el plásmido pJET 1.2 y en los plásmidos basados en el pUA1108 se ha utilizado la enzima comercial T4 *Ligasa (*Thermo scientific). La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos.

Para la fosforilación del DNA empleado en el proceso de mutagénesis en cromosoma se empleó la T4 polinucleótido Kinasa de New England Biolabs.

3.7 Transformación de las bacterias

Las células electro-competentes se prepararon según el protocolo de Wu et al. (Wu et al., 2010).

El método empleado para transformar las bacterias fue la electroporación (electroporador de Bio-Rad a 25µF, 200Ω y 1.25kV), habiendo preparado previamente células electrocompetentes**.** Tras someterlas al shock eléctrico se incubaron en 1ml de LB durante una hora en agitación a 37ºC o 28ºC, y posteriormente se plaquearon en medios de LB agar suplementados con el antibiótico correspondiente.

3.8 Purificación y electroforesis de ADN

La purificación de plásmidos se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ADN plasmídico NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL). La purificación de fragmentos de ADN provenientes de amplificación por PCR o digestiones enzimáticas desde gel de agarosa se realizó mediante el protocolo descrito en el kit Ultraclean 15 ADN Purification kit (MOBIO Laboratorios, Inc.).

Para llevar a cabo la separación de los fragmentos de ADN obtenidos tanto en las reacciones de PCR como en las digestiones, se emplearon geles horizontales de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM, pH8.0) a los que se añadió bromuro de etidio para teñir el ADN. Los geles se sometieron a voltajes constantes de entre 80 y 120V. Las bandas de ADN se observaban en un transiluminador de luz ultravioleta (Chemi Doc de Bio-Rad).

3.9 Subclonaje de la región PilZ de *bcsA*

Para llevar a cabo la mutagénesis de *bcsA* fue necesario realizar antes un subclonaje de este gen. Se realizaron dos PCRs, una con los oligonucleótidos bcsA NdeI Fw y SpeI NotI bcsA AB Rv para amplificar las primeras 1815 pb del gen *bcsA* (fragmento denominado *bcsA_AB*), y la otra con los oligonucleótidos SpeI bcsA CD Fw y bcsA NotI Rv para amplificar las siguientes 813 pb del gen *bcsA* (fragmento denominado *bcsA_CD*). SpeI NotI bcsA AB Rv y SpeI bcsA CD Fw son oligonucleótidos de 40 pb en cuya secuencia hay dos nucleótidos cambiados respecto a la secuencia original de *bcsA*. Estos cambios permitieron insertar la diana de restricción de la enzima SpeI en *bcsA* sin que ésto supusiera un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los dos fragmentos obtenidos mediante PCR se digirieron, en el caso del fragmento AB con las enzimas NdeI y SpeI y en el caso del fragmento CD con las enzimas SpeI y NotI. Posteriormente se ligaron los dos fragmentos con el plásmido pUA1108, obteniéndose de este modo el plásmido pUA1108:*bcsA*, en el que el gen *bcsA* difiere de la secuencia original de *bcsA* en 2 nt, dando lugar a una diana SpeI que se empleó posteriormente en la mutagénesis al azar (Fig. 9).

3.10 Mutagénesis al azar del fragmento CD del gen *bcsA*

Para realizar la mutagénesis al azar sobre el fragmento *bcsA_CD* se empleó el *GeneMorph II Random Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies). Este kit se utiliza para provocar mutaciones al azar durante la amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR que dan lugar a cambios en la secuencia aminoacídica correspondiente. Las mutaciones son introducidas a través de unas ADN polimerasas propensas a cometer errores y también mediante cambios en las condiciones de la reacción de PCR. La frecuencia de mutación se puede modificar en función del número de ciclos de la PCR (a más ciclos, más mutaciones) y en función del ADN diana y el ADN molde. La frecuencia de mutación deseada se puede conseguir modificando la cantidad de ADN diana (fragmento que se desea mutar) frente al ADN molde (plásmido). Los productos de la PCR se clonaron posteriormente en un vector de expresión, que permite observar si existen cambios en la actividad de la proteína.

En este caso, la amplificación se realizó a partir del plásmido pUA1108:*bcsA* (tamaño del molde 6899pb), y el fragmento a mutar fue el *bcsA*_CD (tamaño del fragmento diana: 813pb).

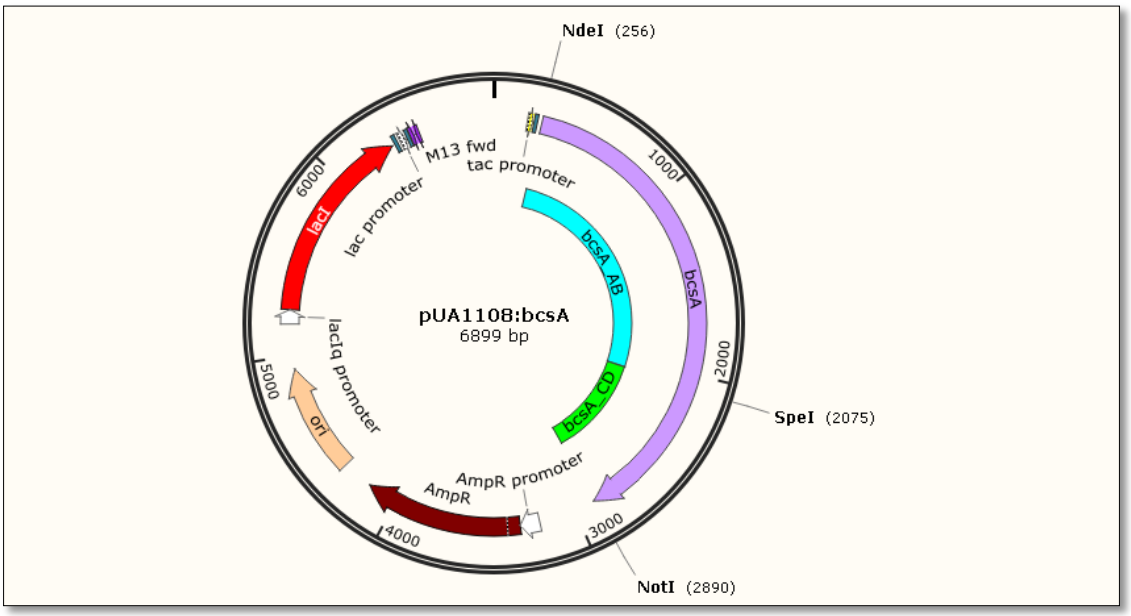

Figura 9. Plásmido pUA1108:*bcsA*.

Para realizar las mutaciones sobre el fragmento *bcsA*_CD, los oligonucleótidos empleados fueron SpeI bcsA CD Fw y bcsA NotI Rv en una proporción 1:1. Para preparar la mezcla de la reacción se atendieron los consejos proporcionados por el fabricante siendo el volumen final de la muestra 50 µl (5 µl de buffer, 1 µl de dNTPs

10mM, 0,25 µl de cada primer, 1 µl de la enzima, y el resto hasta los 50 µl, ADN molde y agua mQ). El cálculo de la cantidad de ADN a añadir a la mezcla se calculó para realizar dos reacciones diferentes. En un principio se realizó una reacción de PCR con 10 µl de ADN molde y posteriormente, para obtener una tasa de mutación mayor, se realizó otra PCR con 6 µl de ADN. La cantidad de ADN a añadir se calculó conociendo la relación entre la proporción de ADN diana /ADN molde y la tasa de mutación asociada (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de las dos PCRs realizadas con el GeneMorph II Random Mutagenesis Kit.

	ADN molde	ADN diana	Tasa de mutación (mutaciones/Kb)	Número de ciclos
1ªPCR	3,5 µg	500 ng	0-4,5	30
2ª PCR	2,5 µg	290 ng	4,5-9	

Los fragmentos *bcsA*_CD amplificados mediante PCR, y el plásmido pUA1108:*bcsA*_AB se digirieron con las enzimas SpeI y NotI. Tras la electroforesis y posterior purificación del ADN se procedió a la ligación del pUA1108:*bcsA* con los diferentes fragmentos de *bcsA*_CD. Se electroporaron 4µl de la reacción de ligación en células electrocompetentes de la cepa WT *ΔadrA stop bcsA ΔcsgBA.* Los transformantes se observaron tras 48horas de incubación a 28ºC, bien en placas de rojo congo o calcofluor, conteniendo en ambos casos ampicilina a distintas concentraciones (100, 150, 200 o 250 µg/ml) e IPTG 0,5mM.

3.11 Construcción del alelo *bcsA* R696A en el cromosoma de la bacteria

Para realizar la mutación de la secuencia que codifica la arginina de la posición 696 de BcsA por una alanina (R696A) en el cromosoma de la bacteria, se empleó un método para generar mutaciones en cromosoma sin dejar cicatrices (Blank *et al.*, 2011). Este método está basado en dos pasos sucesivos de recombinación λ-Red (Gerlach *et al.*, 2009). En el primer paso se integra un cassette de cloranfenicol (clo) flanqueado por un sitio de reconocimiento de la enzima I-SceI en el sitio diana donde se pretende provocar el cambio. En el segundo paso se produce un proceso de recombinación tras la electroporación con DNA de doble cadena de 80 nt de longitud, derivado de oligonuleótidos sintéticos, que contiene la mutación deseada. La expresión de la enzima I-SceI después de esta segunda recombinación da lugar a la muerte de las bacterias en

las que la recombinación ha sido ineficaz y permite por lo tanto la selección de recombinantes que contiene la mutación deseada. I-SceI es una endonucleasa codificada por un intrón de *Saccharomyces cerevisiae* que posee una larga secuencia de reconocimiento (18pb), lo que da lugar a una elevada especificidad de corte en el ADN (Monteilhet *et al.*, 1990).

En concreto, la mutagénesis dirigida se realizó de la siguiente manera:

1) Electroporación del plásmido pWRG99 (Fig.8B) en la cepa a mutar, ΔXII.
2) Amplificación mediante PCR de un fragmento lineal que contiene el cassette de cloranfenicol flanqueado por la diana de I-SceI. Para ello se usó como molde el plásmido pWRG100 (Fig. 8A) y como oligonucleótidos, bcsA clo R696A Fw y bcsA clo R696A Rv. Estos oligonucleótidos, además de hibridar en el plásmido pWRG100 contienen 60 nt homólogos a *bcsA*, lo cual permite la recombinación en cromosoma.
3) Precipitación y diálisis del fragmento lineal de ADN obtenido en la reacción de PCR anterior.
4) Preparación de células competentes de las cepas a transformar, incubándolas en presencia de ampicilina (100 µg/ml) y a 28ºC para evitar la pérdida del plásmido termosensible pWRG99 en presencia de arabinosa para inducir el sistema de recombinasas λ-Red (que se encuentra bajo un promotor inducible por arabinosa). Las células competentes se transformaron con 5 µl del fragmento lineal de ADN obtenido y se plaquearon en LB cloranfenicol (20 µg/ml).
5) Chequeo mediante PCR de los transformantes resistentes a cloranfenicol, para seleccionar uno de ellos que contuviese el cassette de resistencia integrado en la secuencia de *bcsA*.
6) Generación de un dímero de ADN (que contiene la mutación que se desea realizar) a partir de los oligonucleótidos complementarios Dimer bcsA R696A Fw y Dimer bcsA R696A Rv. Para ello se sometió a una mezcla de oligonucleótidos (10 µl de cada uno a 100pmol/µl) a 95ºC durante 15 minutos y posteriormente se dejó enfriar lentamente.
7) Fosforilación del dímero con la enzima T4 polinucleótido kinasa en un volumen final de 20µl (1µ del dímero, 2µl de buffer, 2µl ATP 10mM, 2µl T4

PNK y 13µl agua mQ) durante 30 minutos a 37ºC para aumentar la eficiencia de la recombinación. Dialización del DNA.

8) Preparación de células competentes a partir del transformante seleccionado en el paso 5.
9) Electroporación con 3 µl del dímero y selección en LB agar conteniendo AHT (1000 ng/ml) y ampicilina (100 µg/ml).
10) Análisis de los mutantes mediante PCR utilizando los oligonucleótidos SpeI bcsA CD Fw/bcsA NotI Rv y secuenciación de la PCR correspondiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera aproximación llevada a cabo en este TFM consistió en realizar mutaciones al azar sobre el dominio PilZ de *bcsA* para intentar así conseguir una variante de la proteína BcsA que permitiera el acceso constante del sustrato UDP-Glc al sitio activo de la enzima, es decir una celulosa sintetasa activa en ausencia de c-di-GMP. Para ello, en primer lugar se construyó una cepa de *Salmonella* "testigo" que tuviese una eficacia de transformación alta y que permitiese una selección rápida y fiable de los plásmidos que contuvieran la secuencia de *bcsA* que da lugar a una celulosa sintetasa constitutivamente activa. En segundo lugar, fue necesario construir un plásmido "base" sobre el que clonar fragmentos carboxi terminal de *bcsA* conteniendo el dominio PilZ mutado al azar. Por último se realizó la mutagénesis al azar sobre el fragmento carboxi terminal de *bcsA* para posteriormente clonar las variantes obtenidas en el plásmido base y transformar la cepa testigo. Esta aproximación se describe en detalle a continuación.

4.1 Construcción de la cepa testigo

En un principio, se seleccionó la cepa ΔXII Δ*bcsA*, construida en el laboratorio de Biofilms Microbianos, como cepa testigo para el ensayo descrito, ya que esta cepa, derivada de la cepa salvaje *S.* Enteritidis 3934, es un mutante múltiple en los doce genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, es decir con posible actividad diguanilato ciclasa. Como resultado, esta cepa es incapaz de producir c-di-GMP (Solano *et al.*, 2009, Zorraquino *et al.*, 2013). Además la cepa ΔXII ΔbcsA contiene el gen *bcsA* mutado mediante la inserción de tres codones stop en su secuencia. Sin embargo, al comparar la eficacia de transformación de esta cepa con respecto a la de la cepa salvaje se pudo comprobar que ésta era muy baja y que por lo tanto no podía ser utilizada en el ensayo, ya que uno de los pasos limitantes consiste en obtener el número máximo de transformantes posibles de la cepa testigo.

Por ello, a continuación, se construyó la cepa testigo basada en la cepa salvaje *S.* Enteritidis 3934 Δ*bcsA*. Esta cepa contiene el gen *bcsA* mutado mediante la inserción de tres codones stop en su secuencia y por lo tanto no produce la enzima BcsA. En primer lugar y con objeto de obtener una cepa carente de c-di-GMP, se delecionó el gen *adrA* mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina. *adrA* codifica una diguanilato ciclasa cuya actividad es esencial para la síntesis de c-di-GMP en condiciones de LB sin sal, a temperatura ambiente (Kader et al., 2006). En segundo

lugar, se mutó el operón de síntesis de fimbrias tipo curli *csgBA* mediante la inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina, con el objetivo de construir una cepa testigo completa WT *ΔadrA ΔbcsA ΔcsgBA* que presenta un fenotipo en placas de LB sin sal suplementadas con rojo congo de tipo "saw", fácilmente diferenciable de una cepa derivada de la anterior, que presentase una actividad celulosa sintetasa constitutivamente activa, y que por lo tanto pasaría a presentar un fenotipo "pdar".

En la figura 10 se muestran los fenotipos, en placas de rojo congo, de la cepa salvaje 3934, de los mutantes individuales en *adrA*, *bcsA* o *csgBA* y de la cepa testigo completa WT *ΔadrA ΔbcsA ΔcsgBA*.

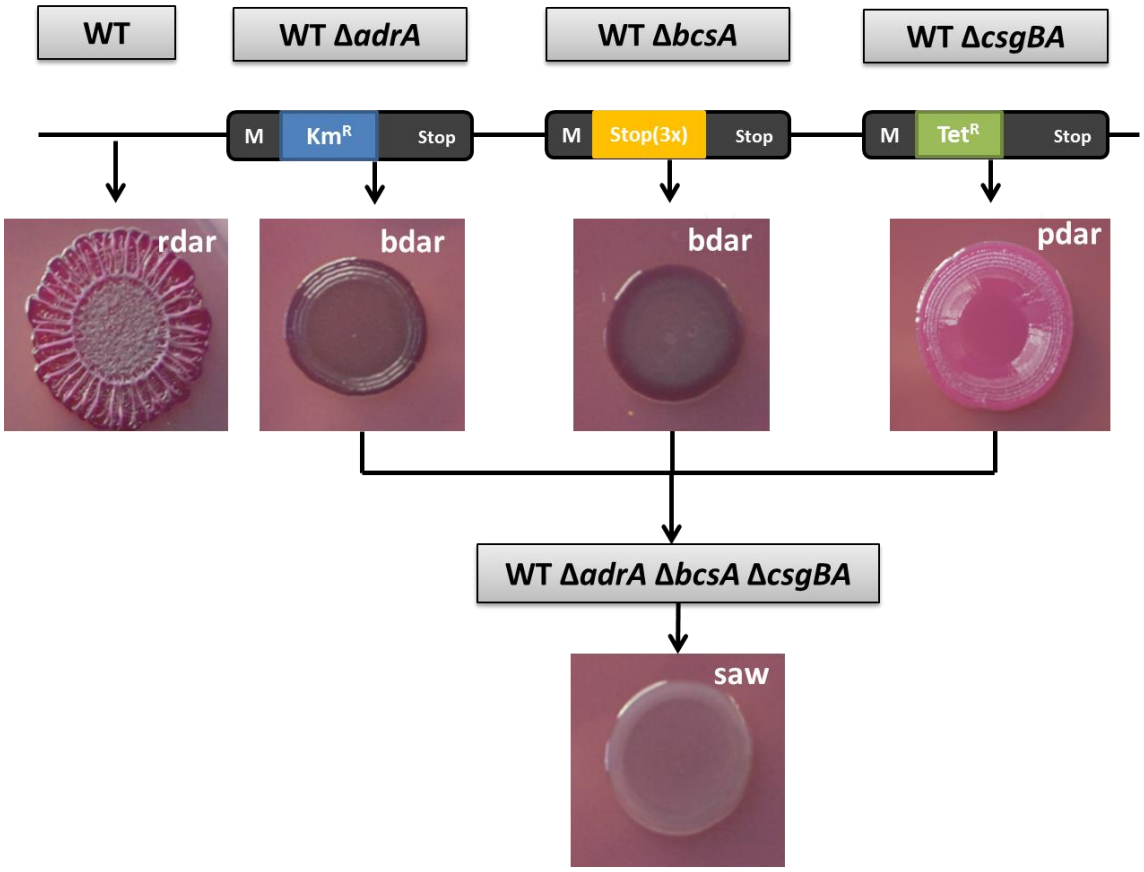

Figura 10. Descripción de la cepa testigo. En la parte superior de la figura se pueden observar los fenotipos obtenidos a partir de las cuatro cepas que se nombran en los cuadros grises. Además en los casos de las cepas mutantes se puede observar el modo en que se ha producido la mutación, siendo los rectángulos los distintos genes, M representa la metionina inicial y stop el codón terminador del gen. En la parte inferior se observa la cepa testigo con su correspondiente fenotipo, siendo esta cepa el resultado de la unión de las tres mutaciones anteriores en una sola cepa.

3.2 Construcción del plásmido base pUA1108::*bcsA*

El plásmido base pUA1108::*bcsA* se construyó tal y como se ha descrito en la sección de "material y métodos". Así, un fragmento conteniendo las primeras 1815 pb del gen *bcsA* (fragmento *bcsA_AB*), se ligó con un fragmento conteniendo el resto del gen *bcsA* (813pb; fragmento denominado *bcsA_CD*) en el plásmido pUA1108 bajo un promotor inducible por IPTG. Además el clonaje se diseñó para que entre los fragmentos AB y CD de *bcsA* existiese una diana reconocida por la enzima SpeI que no daba lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La inserción de esta diana nos permitió posteriormente digerir el plásmido base con las enzimas SpeI/NotI para eliminar el fragmento CD de *bcsA* e introducir fragmentos CD mutados al azar, tal y como se explica en la siguiente sección.

Con el objeto de comprobar que el gen *bcsA* clonado de esta manera y expresado desde el pUA1108 era capaz de producir una proteína BcsA activa en presencia de c-di-GMP, se transformó la cepa WT *ΔbcsA* (bdar) con el plásmido pUA1108::*bcsA*. La cepa resultante adquirió la capacidad de sintetizar celulosa y por lo tanto mostró un fenotipo rdar.

3.3 Mutagénesis al azar sobre el dominio PilZ de bcsA

Mediante el kit *GeneMorph II Random Mutagenesis*, los oligonucleótidos SpeI bcsA CD Fw/bcsA NotI Rv y tomando como ADN molde el plásmido pUA1108::*bcsA*, se amplificaron moléculas de ADN conteniendo el fragmento *bcsA*_CD con mutaciones al azar (Fig. 11A). La mezcla de PCR se corrió en un gel de agarosa, del que se purificó una banda de 813 pb, correpondiente al fragmento CD con las mutaciones. Este producto de PCR se digirió con las enzimas SpeI y NotI. El plásmido pUA1108::*bcsA* base se digirió con las mismas enzimas y se ligó con la mezcla de productos de PCR (Fig. 11B).

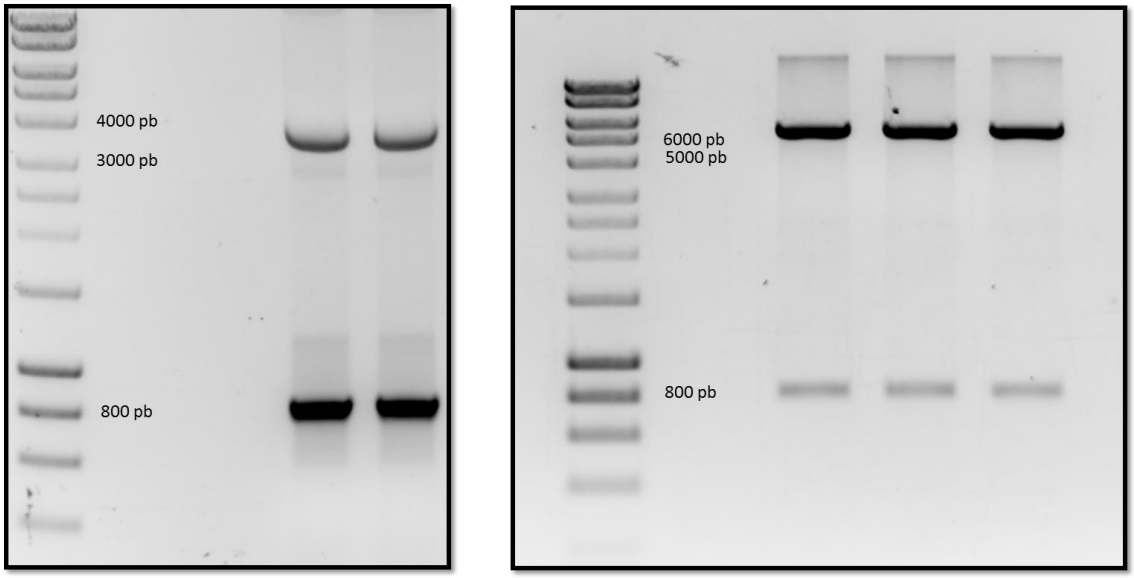

Figura 11. Electroforesis de la PCR mutagénica y del pUA1108:*bcsA*. **A)** Gel de agarosa en el que se ha corrido el producto de la PCR obtenido con el kit GeneMorph II Random Mutagenesis. El fragmento de 800 pb aproximadamente se corresponde con la mezcla de moléculas de *bcsA*_CD conteniendo mutaciones al azar. El fragmento de mayor peso molecular se corresponde con el ADN molde utilizado para la reacción de PCR. **B)** Gel de agarosa en el que se ha corrido el producto de la digestión del pUA1108::bcsA, siendo el fragmento mayor el plásmido con el fragmento AB y el de 800 pb aproximadamente, el fragmento CD.

Los productos de la ligación del pUA1108:*bcsA*_AB con la mezcla de fragmentos CD se electroporaron en células competentes de la cepa testigo, WT Δ*adrA* Δ*bcsA* Δ*csgBA*. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB agar suplementado con rojo congo y ampicilina (100 µg/ml). Tras chequear un número superior a 9000 transformantes, se observó que ninguno adquiría la capacidad de producir celulosa en ausencia de c-di-GMP. Con el objeto de comprobar que el kit había funcionado correctamente, se purificaron plásmidos pUA1108:*bcsA*_AB_CD de tres transformantes y los fragmentos CD de estos plásmidos se secuenciaron utilizando un oligonucleótido de secuenciación del plásmido, el 3´sequencing primer pGEX. Uno de los fragmentos no contenía ninguna mutación, el segundo contenía dos mutaciones (una de ellas daba lugar a un cambio de un Aa en BcsA) y el tercero tres mutaciones (dos de ellas provocaban un cambio de Aa y la tercera consistía en una deleción de 1 nt que provocaba un cambio en el marco de lectura) respecto a la secuencia original de *bcsA*. A continuación, con el objetivo de conseguir una mayor tasa de mutaciones en el fragmento CD se cambiaron las condiciones de la PCR (Tabla 5). Tras realizar un experimento similar al anterior y analizar alrededor de 2000 transformantes, se

comprobó de nuevo que ninguno adquiría la capacidad de producir celulosa en ausencia de c-di-GMP.

3.4 Mutagénesis dirigida de bcsA en cromosoma

Durante la realización de los experimentos anteriores, Morgan *et al* publicaron el artículo *"Mechanism of activation of cellulose synthase by cyclic di-GMP"(Morgan et al., 2014)* en la revista Nature Structural & Molecular Biology, centrado en el estudio de la estructura de la celulosa sintetasa del organismo *Rhodobacter sphaeroides.* Los autores del artículo, mediante el estudio de la estructura *in vitro* de la proteína, proponen que BcsA, en ausencia de c-di-GMP, se encuentra en un estado autoinhibido que impide la entrada de la UDP-Glc al sitio activo de la enzima. Cuando el c-di-GMP está presente se elimina ese estado autoinhibido mediante la ruptura de un puente salino formado entre el ácido glutámico de la posición 371 y la arginina de la posición 580. Además demuestran que una mutación de la arginina 580 por una alanina genera una celulosa sintetasa constitutiva "*in vitro*", capaz de producir celulosa en ausencia de c-di-GMP. Estos resultados hicieron que se cambiase la aproximación genética de este TFM con el objetivo de analizar si la mutación de la primera arginina presente en el motivo RxxxR del dominio PilZ de BcsA da lugar a una proteína BcsA constitutivamente activa "in vivo".

En primer lugar se realizó un alineamiento de la secuencia de BcsA de *Rhodobacter sphaeroides* y *S.*Enteritidis para comprobar la presencia de dominios y residuos importantes para la actividad celulosa sintetasa de BcsA descritos en Morgan et al. (Morgan *et al.*, 2014) (Fig. 12).

```
Rhod ------------------------------------------------------------
Sal  MSALSRWLLIPPVSARLSERYQGYRRHGASPFSAALGCLWMILAWIVFPLEHPRWQRIRD 60

Rhod ------MTVRAKARSPLRVVPVLLFLLW-------------------------------- 22
Sal  EHKALYPHINAARPRPLDPARYLIQTLWLVMISSTKERHEPRWRSFARLKDVRGRYHQWM 120
             :.*    **  .  *:  **

Rhod -------------------------------VALLVPFGLLA-----AAPVAPSAQGLIA 46
Sal  DTLPERVRQKTTHLEKEKELGHLSNGARRFILGVIVTFSLILALICITQPFNPLSQFIFL 180
                                     :.::* *.*:      : *. * :* ::

Rhod LSAVVLVALLKPFADKMVPRFLLLSAASMLVMRYWFWRLFETLPPPALDASFLFALLLFA 106
Sal  LLLWGVALLVRRMPGR-FSALMLIVLSLTVSCRYIWWRYTSTLNWDD-PVSLVCGLILLF 238
     *    :. *:: :  : .  ::*:  :  :  ** :**  .**      .*:: .*:*:

Rhod VETFSISIFFLNGFLSAD-PTDRPFPRPLQPEELPTVDILVPSYNEPADMLSVTLAAAKN 165
Sal  AETYAWIVLVLGYFQVVWPLNRQPVPLPKEMSQWPTVDIFVPTYNEDLNVVKNTIYASLG 298
     .**::  ::.*  *  .   . :*.* * : .: *****:**:***  ::::. *: *:

Rhod MIYPARLRTVVLCDDGGTDQRCMSPDPELAQKAQERRRELQQLCRELGVVYSTRERNEHA 225
Sal  IDWPKDKLNIWILDDGGRE-------------------SFRHFARHVGVHYIARATHEHA 339
     : :*    .: : **** :                   .:::::.*.:** * :*  .***

Rhod KAGNMSAALERLKGELVVVFDADHVPSRDFLARTVGYFVEDPDLFLVQTPHFFINPDPIQ 285
Sal  KAGNINNALKHAKGEFVAIFDCDHVPTRSFLQMTMGWFLKEKQLAMMQTPHHFFSPDPFE 399
     ****:. **:: ***:*.:**.****:*.**  *:*:*::: :* ::****.*:.***::

Rhod RNLALGDRCPPENEMFYGKIHRGLDRWGGAFFCGSAAVLRRRALDEAGGFAGETITEDAE 345
Sal  RNLGRFRKTPNEGTLFYGLVQDGNDMWDATFFCGSCAVIRRKPLDEIGGIAVETVTEDAH 459
     ***.   : * *  :*** :: * * * .:*****.**:**: *** **:* **:****.

Rhod TALEIHSRGWKSLYIDRAMIAGLQPETFASFIQQRGRWATGMMQMLLLKNPLFRRGLGIA 405
Sal  TSLRLHRRGYTSAYMRIPQAAGLATESLSAHIGQRIRWARGMVQIFRLDNPLFGKGLKLA 519
     *:*.:* **:.* *:     ***  *.:::.* ** *** **:*:: *.**** :** :*

Rhod QRLCYLNSMSFWFFPLVRMMFLVAPLIYLFFGIEIFVATFEEVLAYMPGYLAVSFLVQNA 465
Sal  QRLCYLNAMFHFLSGIPRLIFLTAPLAFLLLHAYIIYAPALMIALFVIPHMVHASLTNSK 579
     *******:* .::  : *::**.*** :*::   *: *    :  ::  ::. : *.:.

Rhod LFARQRWPLVSEVYEVAQAPYLARAIVTTLLRPRSARFAVTAKDETLSENYISP-IYRPL 524
Sal  IQGKYRHSFWSEIYETVLAWYIAPPTLVALINPHKGKFNVTAKGGLVEEKYVDWVISRPY 639
     : .: *  : **:**.. * *:*   :.:*:.*:..:* ****   :.*:*:.  * **

Rhod LFTFLLCLSGVLATLVRWVAFPGDRSV-LLVVGGWAVLNVLLVGFALRAVAEKQQRRAAP 583
Sal  IFLVLLNLLGVAAGVWRYYYGPENETLTVIVSLVWVFYNLVILGGAVAVSVESKQVRRAH 699
     :* .** * ** * : *:   * :.:: ::*   *.. *::::* *: . .*.:* * *

Rhod RVQMEVPAEAQIPAFGNRSLTATVLDASTSGVRLLVRLPGVGDPHPALEAGGLIQ-FQPK 642
Sal  RVEIAMPGAIAR--EDGHLFSCTVHDFSDGGLGIKI--NGQAQVLEGQKVNLLLKRGQQE 755
     **:: :*.         : ::.** * * .*: : :   * .:   . :.  *::  * :

Rhod FPDAPQLERMVRGRIRSARREGGTVMVGVIFEAGQPIAVRETVAY--LIFGESAHWRTMR 700
Sal  YVFPTQVV-------RVTGNEVGLQL--------MPLTTKQHIDFVQCTFARADTWALWQ 800
     :    *:        * : .* *  :         *::.:: : :    *..:  *   :

Rhod EAT--MRPIGLLHG---------------------------MARILWMAAASLPKTARDF 731
Sal  DSFPEDKPLESLLDILKLGFRGYRHLAEFAPPSVKVIFRSLTALIAWIVSFIPRRPERQA 860
     ::    :*:  *                              * * *:.:    :  *:

Rhod MDEPARRRRRHEEPKEKQAHLLAFGTDFSTEPDWAGELLDPTAQVSARPNTVAWGSN 788
Sal  AIQP-------------------------------------SDRVMAQAQQ------ 874
         :*                                            :  :* *:  :
```

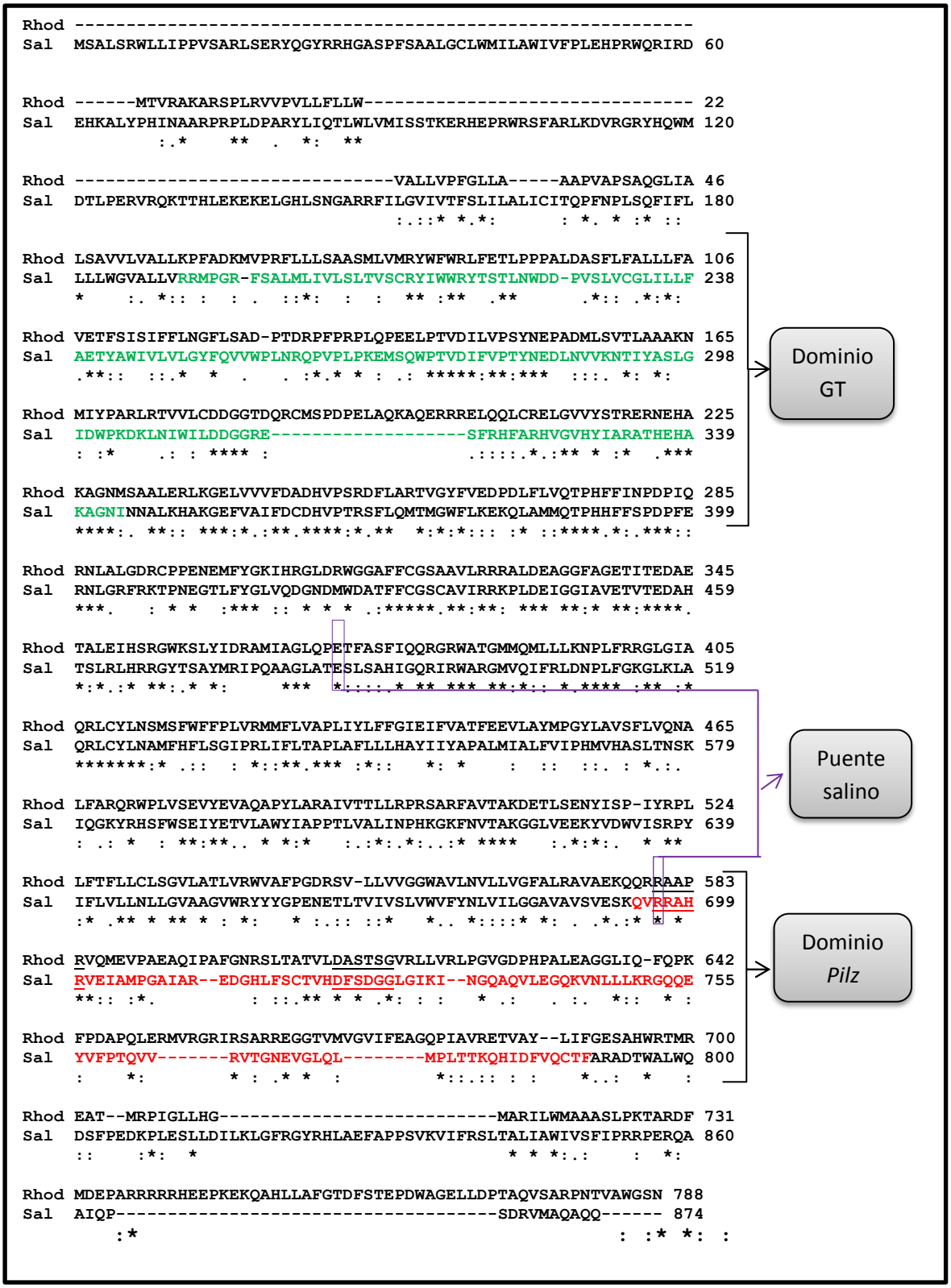

Figura 12. Alineamiento de BcsA de *Rhodobacter sphaeroides y S.Enteritidis.* En verde aparecen los aminoácidos del dominio glicosiltransferasa. En rojo el dominio Pilz, y dentro de éste subrayados los motivos de unión a c-di-GMP: RXXXR y DXSXXG. En morado se marcan los aminoácidos que forman el puente salino del estado autoinhibido de la celulosa sintetasa (E371-R580 en *Rhodobacter;* E485-R696 *Salmonella).*

Los dominios que favorecen el estado de autoinhibición de BcsA citados en el trabajo de Morgan et al. se encuentran muy conservados en el caso de BcsA de *Salmonella*. Por ello, a continuación, se realizó una mutagénesis dirigida sobre el gen *bcsA* en cromosoma, para provocar el cambio de la primera arginina del dominio RXXXR por una alanina, que en el caso de *Salmonella* se corresponde con la arginina en la posición 696 (R696A). Este cambio se realizó mediante el método de mutagénesis descrito en el apartado de Materiales y Métodos (Blank *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta el codon usage de *Salmonella enterica subespecie enterica serovar Typhi*.

La mutagénesis se realizó sobre la cepa ΔXII transformada con el plásmido pWRG99 y se realizó mediante dos recombinaciones consecutivas. En la primera de ellas se introdujo el cassette de cloranfenicol (*cat*) y la diana I-SceI mediante recombinación con zonas homólogas al gen *bcsA*, obteniéndose así la cepa intermedia del proceso ΔXII *bcsA*::clo. Estos transformantes se chequearon mediante PCR utilizando los oligos SpeI bcsA CD Fw y bcsA NotI Rv que amplifican un fragmento de 800pb en el caso de cepas salvajes o un fragmento de 1800pb en el caso de los mutantes insercionales cloranfenicol resistentes (Fig. 13).

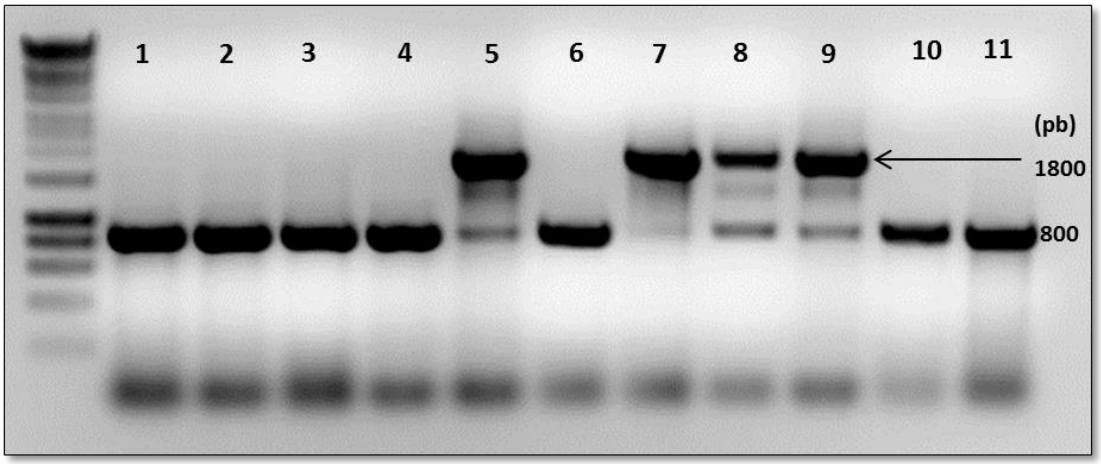

Figura 13. Gel de agarosa en el que se corrió la PCR de chequeo de diez transformantes ΔXII *bcsA*::clo resistentes a cloranfenicol. Una banda de 1800pb aproximadamente indica la inserción del gen de resistencia a cloranfenicol y la diana SceI en el gen *bcsA*. La undécima muestra es un fragmento amplificado desde la cepa ΔXII que se empleó como control negativo.

A partir de un transformante ΔXII *bcsA*::clo se prepararon células competentes que fueron electroporadas con el dímero formado por los oligos Dimer bcsA R696A Fw y Rv. En un segundo proceso de recombinación con el dímero de ADN se introdujo el cambio en la secuencia de *bcsA* correspondiente a R696A a la vez que se eliminó el cassette de cloranfenicol. Los transformantes, sensibles a cloranfenicol, se seleccionaron

en presencia de AHT_{1000} Amp_{100}, lo cual permite la selección de aquellas bacterias que han perdido la secuencia diana de la enzima SceI en el cromosoma.

A partir de un transformante seleccionado, se amplificó el fragmento CD de *bcsA* con los oligonucleótidos SpeI bcsA CD Fw/bcsA NotI Rv y el producto de PCR se envió a secuenciar. Como se observa en la figura 14, la cepa ΔXII_BcsA R696A obtenida presentó los cambios de secuencia esperados que dan lugar a una proteína BcsA mutante en la arginina en posición 696 a alanina.

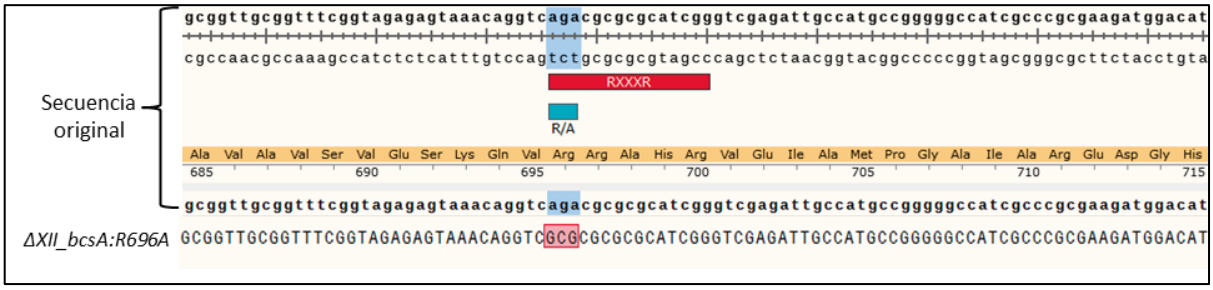

Figura 14. Alineamiento de *bcsA* original y *bcsA*_R696A. Se observa parte del alineamiento de la secuencia original de *bcsA* de *Salmonella* con la secuencia de *bcsA* de la cepa ΔXII que se mutó mediante el método del dímero. En azul aparece marcada la secuencia nucleotídica de la arginina de la posición 696, y en rojo aparecen marcados los nucleótidos que difieren de la secuencia original *bcsA*.

A continuación se analizó la capacidad de síntesis de celulosa de la cepa ΔXII_BcsA R696A tras su incubación durante 48 horas a 28°C en placas de rojo congo. Los resultados indicaron que esta cepa es incapaz de sintetizar celulosa ya que el fenotipo mostrado fue bdar. Es decir, contrariamente a lo esperado, el cambio de la primera arginina del motivo RxxxR del dominio PilZ de la celulosa sintetasa de *Salmonella* no da lugar a una proteína constitutivamente activa, en ausencia de c-di-GMP.

Para comprobar que durante el proceso de mutagénesis no se habían generado otras mutaciones en genes esenciales para la síntesis de celulosa, se introdujo un promotor constitutivo delante del gen *adrA* en la cepa ΔXII_BcsA R696A, dando lugar a una cepa ΔXII_BcsA R696A con altos niveles de c-di-GMP, y ésta se complementó con el plásmido pUA1108:*bcsA*. La cepa original ΔXII *PcL rbs adrA* BcsA R696A presentó un fenotipo bdar, mientras que la cepa complementada fue capaz de producir celulosa, presentando un fenotipo rdar. Estos resultados demuestran que la cepa ΔXII_BcsA R696A no presenta mutaciones adicionales que impidan la producción de

celulosa. Además, el hecho de que la cepa ΔXII *PcL rbs adrA* BcsA R696A presente un fenotipo bdar indica que el alelo BcsA mutado R696A es incapaz de producir celulosa incluso en presencia de c-di-GMP (Fig. 15).

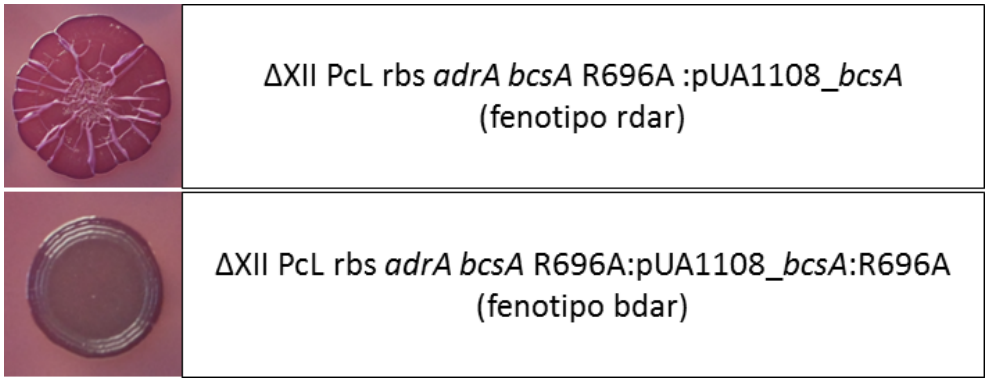

Figura 15. Colonias en rojo congo de ΔXII PcL rbs *adrA bcsA* R696A complementado con la secuencia original de *bcsA* y con la secuencia de *bcsA* que lleva el cambio R696A.

5. CONCLUSIONES

1. Hemos realizado una mutagénesis al azar sobre el dominio PilZ de BcsA. Ninguna de las variante de celulosa sintetasa conseguidas era capaz de activar la síntesis de celulosa en ausencia de c-di-GMP.
2. La cepa de *Salmonella Enteritidis* ΔXII proporciona un excelente fondo genético para la selección *in vivo* de variantes enzimáticas activas en ausencia de c-di-GMP
3. La sustitución de la arginina en posición 696 por alanina en la celulosa sintetasa de *Salmonella Enteritidis* provoca la inactivación de la enzima, a diferencia de lo que ha sido descrito para la celulosa sintetasa de *Rhodobacter sphaeroides.*

BIBLIOGRAFÍA

Amikam, D. & M.Y. Galperin, (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.

Blank, K., M. Hensel & R.G. Gerlach, (2011) Rapid and highly efficient method for scarless mutagenesis within the Salmonella enterica chromosome. *PloS one* **6**: e15763.

Bochner B., (1984) Curing bacterial cells of lysogenic viruses by using UCB indicator plates. *Biotechniques* **Sept/Oct.**: 234-240.

Da Re, S., B. Le Quere, J.M. Ghigo & C. Beloin, (2007) Tight modulation of Escherichia coli bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and environmental microbiology* **73**: 3391-3403.

Gerlach, R.G., D. Jackel, S.U. Holzer & M. Hensel, (2009) Rapid oligonucleotide-based recombineering of the chromosome of Salmonella enterica. *Applied and environmental microbiology* **75**: 1575-1580.

Gerstel, U. & U. Romling, (2001) Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in Salmonella typhimurium. *Environmental microbiology* **3**: 638-648.

Jenal, U. & J. Malone, (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual review of genetics* **40**: 385-407.

Jonas, K., H. Tomenius, A. Kader, S. Normark, U. Romling, L.M. Belova & O. Melefors, (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in Salmonella biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC microbiology* **7**: 70.

Kader, A., R. Simm, U. Gerstel, M. Morr & U. Romling, (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* **60**: 602-616.

Karatan, E. & P. Watnick, (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **73**: 310-347.

Karunakaran, E., J. Mukherjee, B. Ramalingam & C.A. Biggs, (2011) "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied microbiology and biotechnology* **90**: 1869-1881.

Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J.M. Ghigo, C. Gamazo, J.R. Penades & I. Lasa, (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Molecular microbiology* **58**: 1322-1339.

Lee, K.Y., G. Buldum, A. Mantalaris & A. Bismarck, (2014) More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular bioscience* **14**: 10-32.

Medina-Ruiz, L., S. Campoy, C. Latasa, P. Cardenas, J.C. Alonso & J. Barbe, (2010) Overexpression of the recA gene decreases oral but not intraperitoneal fitness of Salmonella enterica. *Infection and immunity* **78**: 3217-3225.

Monteilhet, C., A. Perrin, A. Thierry, L. Colleaux & B. Dujon, (1990) Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron. *Nucleic acids research* **18**: 1407-1413.

Morgan, J.L., J.T. McNamara & J. Zimmer, (2014) Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature structural & molecular biology* **21**: 489-496.

Morgan, J.L., J. Strumillo & J. Zimmer, (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**: 181-186.

Omadjela, O., A. Narahari, J. Strumillo, H. Melida, O. Mazur, V. Bulone & J. Zimmer, (2013) BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 17856-17861.

Robijns, S.C., S. Roberfroid, S. Van Puyvelde, B. De Pauw, E. Uceda Santamaria, A. De Weerdt, D. De Coster, K. Hermans, S.C. De Keersmaecker, J. Vanderleyden & H.P. Steenackers, (2014) A GFP promoter fusion library for the study of Salmonella biofilm formation and the mode of action of biofilm inhibitors. *Biofouling* **30**: 605-625.

Romling, U., M.Y. Galperin & M. Gomelsky, (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **77**: 1-52.

Ryjenkov, D.A., R. Simm, U. Romling & M. Gomelsky, (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of biological chemistry* **281**: 30310-30314.

Schmieger, H., (1972) Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Molecular & general genetics : MGG* **119**: 75-88.

Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz & U. Romling, (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* **53**: 1123-1134.

Solano, C., B. Garcia, C. Latasa, A. Toledo-Arana, V. Zorraquino, J. Valle, J. Casals, E. Pedroso & I. Lasa, (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 7997-8002.

Solano, C., B. Garcia, J. Valle, C. Berasain, J.M. Ghigo, C. Gamazo & I. Lasa, (2002) Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular microbiology* **43**: 793-808.

Standal, R., T.G. Iversen, D.H. Coucheron, E. Fjaervik, J.M. Blatny & S. Valla, (1994) A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in Acetobacter xylinum are colocalized with the bcs operon. *Journal of bacteriology* **176**: 665-672.

Wu, N., K. Matand, B. Kebede, G. Acquaah & S. Williams, (2010) Enhancing DNA electrotransformation efficiency in Escherichia coli DH10B electrocompetent cells. *Electronic Journal of Biotechnology* **13**: 0-0.

Zorraquino, V., B. Garcia, C. Latasa, M. Echeverz, A. Toledo-Arana, J. Valle, I. Lasa & C. Solano, (2013) Coordinated cyclic-di-GMP repression of Salmonella motility through YcgR and cellulose. *Journal of bacteriology* **195**: 417-428.