

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen
Volume 47

Número
Number 3-4

Julio-Diciembre
July-December 2005

Artículo:

Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



medigraphic.com

Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano

Micaela Marcela Méndez-Ortiz,* Jorge Membrillo-Hernández*

Vol. 47, Nos. 3-4
Julio - Septiembre. 2005
Octubre - Diciembre. 2005
pp. 130 - 139

RESUMEN. La disponibilidad de las secuencias de múltiples genomas de bacterias ha permitido estudiar la presencia de dominios proteicos comunes para muchas especies bacterianas. Recientemente se han descrito los dominios GGDEF y EAL los cuales presumiblemente tienen la función de diguanilato ciclasa (c-di-GMP sintasa) y fosfodiesterasa de c-di-GMP respectivamente. El c-di-GMP se ha involucrado en la producción de celulosa bacteriana así como en la modificación de la superficie celular que le permite regular la formación de biopelículas, la motilidad y la virulencia entre otros procesos bacterianos.

Palabras clave: Dominio GGDEF, dominio EAL, c-di-GMP, diguanilato ciclasa, fosfodiesterasa.

ABSTRACT. The availability of multiple bacterial genome sequences has led to the discovery of several conserved domains of proteins. Recently, GGDEF and EAL domains have been described as domains responsible for the synthesis and degradation of c-di-GMP, a second messenger in bacteria. c-di-GMP has been involved in cellulose production and identified as a global regulator of several processes such as biofilm formation, motility and virulence, presumably through a modification of the cell surface properties.

Key words: GGDEF domain, EAL domain, c-di-GMP, diguanylate cyclase, phosphodiesterase.

INTRODUCCIÓN

Entender cómo los organismos reconocen los distintos ambientes que los rodean así como los mecanismos que utilizan para adaptarse a sus nichos ha sido de amplio interés en la biología.

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de transducción de señales para responder a los cambios ambientales, por ejemplo, los sistemas de dos componentes, ampliamente distribuidos en estos organismos, que consisten de una proteína histidina cinasa, por lo regular anclada a la membrana, la cual posee un residuo de histidina que al detectar una señal ambiental específica se fosforila en forma dependiente de ATP y puede transferir el grupo fosfato a un segundo componente, llamado regulador de respuesta, que frecuentemente es un factor transcripcional encargado de la regulación de genes involucrados en esa respuesta.¹⁸

Existe otra forma de transducción de señales en las bacterias y es el caso de los segundos mensajeros. El más estudiado en *Escherichia coli* y en otras bacterias es la molécula monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) la cual es una molécula de bajo peso molecular que entre muchas funciones, se une al factor transcripcional CRP en la represión catabólica.⁴⁵

Otro segundo mensajero en bacterias es la molécula tetrafosfato de guanidina (ppGpp), que se produce en respuesta a la limitación de nutrientes y en circunstancias que detienen el crecimiento bacteriano. El ppGpp se une directamente a las unidades β y β' de la RNA polimerasa y afecta un gran número de funciones fisiológicas, principalmente la transcripción de genes relacionados con el crecimiento, con la respuesta a estrés y con la respuesta a la falta de nutrientes.²⁷

En las bacterias se encuentra al menos otro segundo mensajero: el bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP). La función del c-di-GMP se ha estudiado poco; recientemente se ha reportado que lo sintetizan proteínas con actividad de diguanilato ciclasa a partir de dos moléculas de GTP y que poseen en su estructura el dominio conservado llamado GGDEF. El c-di-GMP lo hidrolizan fosfodiesterasas que poseen el dominio EAL.

Las proteínas con dominios GGDEF y EAL se distribuyen ampliamente en las bacterias y los análisis *in silico* han mostrado que las proteínas que los poseen se asocian a muchos dominios que funcionan como sensores. Sin embargo, su papel fisiológico aún se desconoce y ha despertado un creciente interés entre los microbiólogos por descubrirlo. La presente revisión intenta recopilar los trabajos más recientes en los que se ha relacionado a las proteínas con dominios GGDEF y EAL, involucrados en el recambio celular de c-di-GMP.

EL SEGUNDO MENSAJERO C-DI-GMP

El bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) es un dinucleótido cíclico que consiste de dos residuos de riboguanosina unidos por enlaces 2'-5' fosfodiés-

* Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

ter que forman una estructura cíclica (Fig. 1). La estructura cristalina de dicha molécula muestra una columna rígida formada por dímeros intercalados y el análisis de espectroscopia de masas sugirió un arreglo de cuatro moléculas de c-di-GMP alineados para formar dos cuartetos de guanina paralelos con una cavidad central.^{10,26} El carácter ácido del c-di-GMP le permite formar sales con iones presentes en el medio como Li^+ , Na^+ y K^+ y algunos análisis de espectroscopia de UV, de dicroísmo circular y de resonancia magnética nuclear mostraron que el c-di-GMP en solución puede adoptar distintas formas estructurales (polimorfismos) dependiendo del ion al que se asocie. Sin embargo, la estructura de cuartetos de guanina en presencia de iones K^+ es la que más se favorece.⁵² La demanda de c-di-GMP para el estudio de sus funciones fisiológicas ha conducido al desarrollo de métodos para su síntesis química.^{23,35,52}

El c-di-GMP se identificó inicialmente como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa (CS) en la bacteria productora de celulosa *Acetobacter xylinum*, ya que incrementa la actividad de la síntesis de este polímero de manera específica.³⁷ La enzima encargada de sintetizar c-di-GMP es la proteína diguanilato ciclasa (DGC) y la proteína que lo degrada tiene actividad de fosfodiesterasa (PDEA).³⁸ Recientemente se ha reportado que el c-di-GMP está implicado en otros procesos celulares bacterianos como formación de las biopelículas, la motilidad y la virulencia, entre otros.⁸

DESCRIPCIÓN DE LOS DOMINIOS GGDEF Y EAL

Los dominios GGDEF y EAL se han descrito recientemente y se distribuyen ampliamente en procariotes.⁴⁷

El dominio GGDEF consta de aproximadamente 170 residuos de aminoácidos y recibe este nombre debido al patrón de secuencia conservado GG[DE][DE]F. Este dominio se carac-

terizó por primera vez en la proteína PleD de *Caulobacter crescentus*, un regulador de respuesta que se requiere para la transición de células motiles flageladas a células no motiles las cuales tienen una estructura llamada prosteca, que es una elongación de la célula que le permite adherirse a superficies.¹

En una búsqueda de proteínas homólogas a las que tienen el dominio GGDEF se encontró que este dominio está relacionado estructuralmente con la familia de las adenilato ciclasas. La comparación por métodos bioinformáticos de estas proteínas muestra la conservación de dominios y de residuos catalíticos importantes así como de patrones de hidrofobicidad similares, lo cual sugiere que ambas familias se relacionan evolutivamente y que probablemente los mecanismos de catálisis son similares.³¹

Los dominios GGDEF han llamado la atención por estar altamente conservados y reiterados en los genomas bacterianos, aunque las bacterias Gram positivas tienden a tener menos proteínas con este dominio que las Gram negativas, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* tiene sólo una proteína con el dominio GGDEF, *Bacillus subtilis* tiene 4 proteínas con este dominio, ambas Gram positivas. En contraste, *Synechocystis* sp tiene 22, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 tiene 33, *Escherichia coli* K-12 tiene 19, *Vibrio cholerae* O1 biotipo ElTor tiene 41 y *Aquifex aeolicus*, 12 proteínas con el dominio GGDEF, todas ellas Gram negativas (Tabla 1).^{13,31}

El dominio EAL que se denomina así por sus residuos conservados (glutamato-alanina-leucina) consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y se describió originalmente en la proteína BvgR de *Bordetella pertusis*, un factor transcripcional que regula los genes de virulencia (*vrg*) en esta bacteria.^{13,28}

Por otro lado, el dominio EAL se descubrió independientemente como un dominio adyacente al dominio GGDEF posible responsable de la actividad de fosfodiesterasa de c-di-

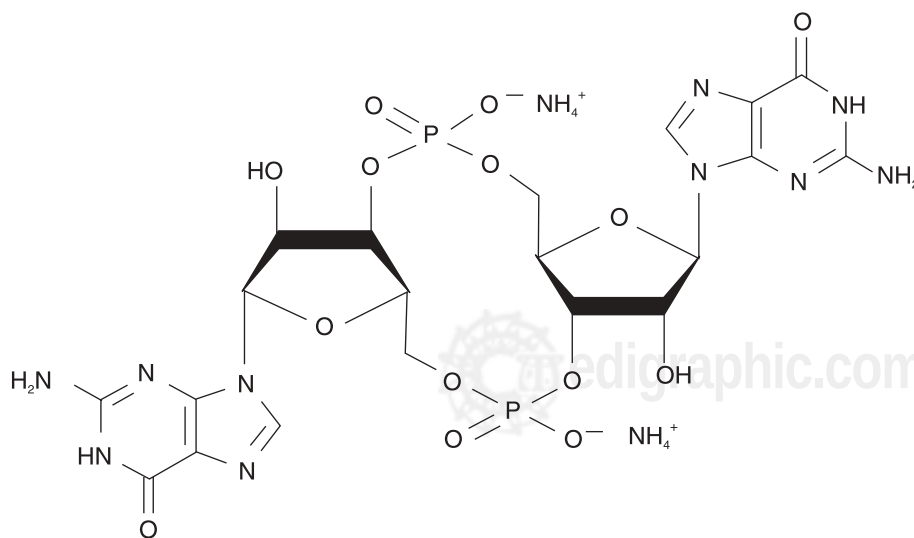


Figura 1. Estructura química del c-di-GMP. G, guanosina.

GMP en la proteína PDEA1 de *A. xylinum*.⁴⁶ Este dominio contiene residuos de aminoácidos de carácter ácido que podrían participar en la unión a metales y potencialmente podrían formar un sitio activo de fosfodiesterasa. Al igual que el dominio GGDEF, el dominio EAL también se encuentra en varias proteínas de un mismo genoma bacteriano (Tabla 1).¹³

LOS DOMINIOS PROTEICOS GGDEF Y EAL SE ENCUENTRAN ASOCIADOS A DOMINIOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La disponibilidad de secuencias completas de genomas bacterianos ha permitido descubrir que ambos dominios GGDEF y EAL se encuentran asociados a muchos dominios receptores que participan en redes de transducción de señales (Fig. 2).

Entre los dominios asociados a GGDEF y a EAL se encuentran los dominios PAS y GAF.¹¹ Los dominios PAS se distribuyen ampliamente en las bacterias, las arqueas y los eucariotes y están frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales. Estos dominios comparten un plegamiento típico de cadenas $\alpha\beta$, comparten menos del 15% de identidad de secuencias y están acoplados a actividades enzimáticas o a dominios de unión a DNA. Entre las señales que detectan los dominios PAS se encuentra el oxígeno, la luz, el voltaje, el potencial redox y los hidrocarburos aromáticos.^{15,50}

Los dominios GAF también son dominios de señalización que se encuentran en el citoplasma, tienen una estructura similar a los dominios PAS, y se caracterizan por tener

una estructura de bolsillo que pueden albergar pequeñas moléculas como ligantes.¹¹ Los dominios GAF se describieron originalmente como dominios conservados de unión a GMPc en fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos.¹³

Por otro lado, en algunas bacterias, los dominios GGDEF y los EAL se asocian con los dominios CACHE (por la denominación en inglés *calcium and chemotaxis*) propios de los canales de Ca^{2+} y de los receptores de quimiotaxis, además, también se encuentran en homólogos a las tres principales clases de proteínas sensoras, las histidinas cinasas de clase I, las metil aceptoras (MCP's) y las adenilato ciclasas.^{50,53}

Los dominios GGDEF y EAL también se asocian al dominio CHASE (llamado así por la denominación en inglés *cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular domain*), módulo extracelular presente en varias proteínas sensoras, y aunque es menos común que el dominio CACHE, también se puede encontrar en histidinas cinasas, adenilato ciclasas y posibles diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas aunque no en sistemas de quimiotaxis.^{50,53}

El dominio MHYT (descrito en inglés como *Met-His-containing YkoW transmembrane domain*) es un dominio transmembranal que se encuentra en los sensores del tipo histidina cinasa presentes en los genomas de *Bacillus subtilis*, de *Caulobacter crescentus*, de *Mesorhizobium loti* y de *Pseudomonas aeruginosa*. Este dominio consiste de seis segmentos transmembranales interconectados por regiones citoplásmicas y regiones periplásmicas cortas ricas en arginina. En estas bacterias el dominio MHYT se encuentra en muchas proteínas como dominio único o bien fusionado a otros dominios de señalización tales como el PAS, el GGDEF, el EAL, el CheY y el HTH. La función de este dominio no se conoce pero podría formar centros de cobre útiles en la detección del O_2 , del NO y del CO.¹²

Los dominios NIT (por la designación en inglés *nitrate- and nitrite-sensing*), MASE1 y MASE2 (por la designación en inglés *membrane-associated sensor*) se descubrieron por medio del análisis de las secuencias de los genomas bacterianos. La función de éstos se desconoce pero se propone que podrían participar en la detección del nitrato y del nitrito para el caso de NIT o bien para la detección de hierro y oxígeno en el caso de MASE1 y MASE2. Estos dominios se encuentran ligados a dominios de señalización y también a los dominios GGDEF y EAL, al igual que el dominio HAMP característico de las proteínas histidina cinasas, adenilato ciclasas y MCP's.^{29,40}

Finalmente, el dominio HNOB (por la designación en inglés *heme-nitric oxide binding*) se asocia al dominio GGDEF. Este dominio se encontró originalmente en las proteínas guanilato ciclasa solubles de eucariotes pero también en algunas proteínas de bacterias que participan como sensores en la quimiotaxis.²⁰

Tabla 1. Número de copias de los dominios GGDEF y EAL presentes en algunas bacterias.

Bacteria	GGDEF	EAL
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	8
<i>Bacillus halodurans</i>	4	2
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	0
<i>Caulobacter crescentus</i>	11	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	16	5
<i>Escherichia coli</i>	19	17
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0
<i>Mesorhizobium loti</i>	32	18
<i>Mycobacterium leprae</i>	3	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	21
<i>Synechocystis</i> sp	23	13
<i>Thermotoga marítima</i>	11	0
<i>Vibrio cholerae</i>	41	22
<i>Xylella fastidiosa</i>	3	3

Datos tomados de Galperin MY et al.¹³

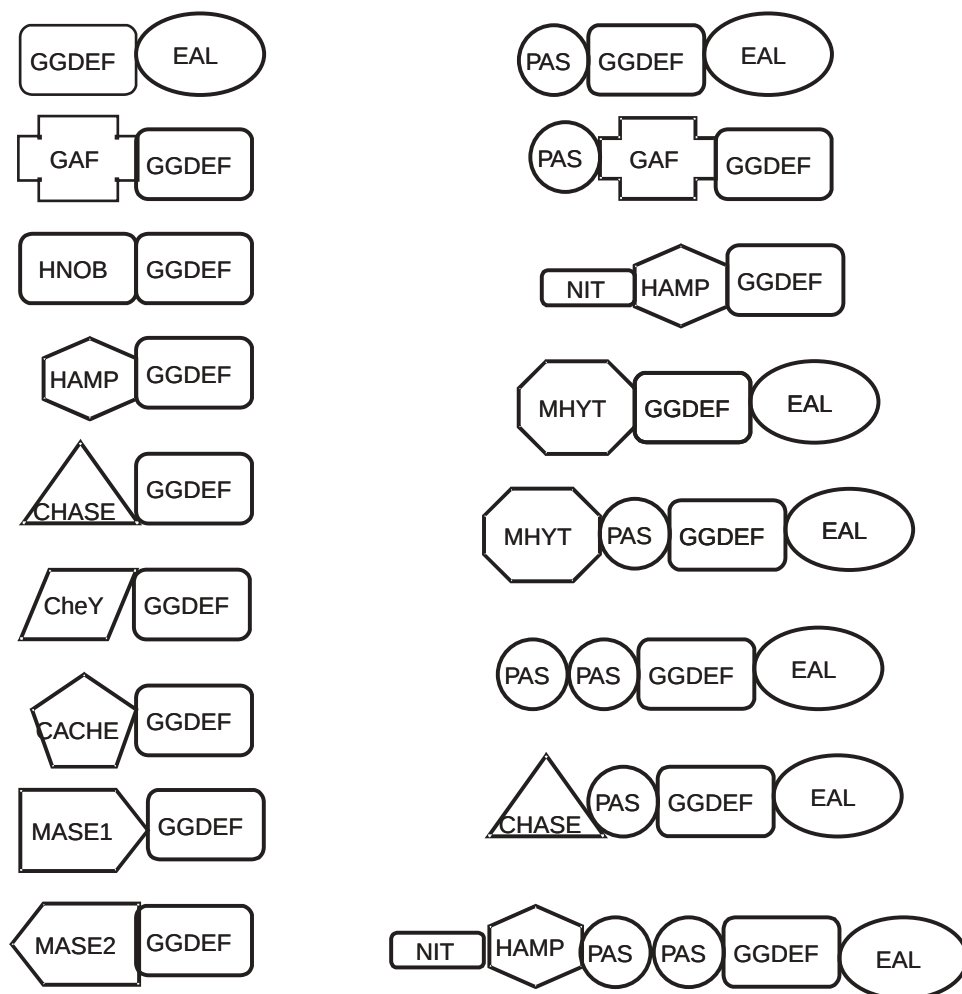


Figura 2. Asociación de los dominios GGDEF y EAL con otros dominios de señalización celular.

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS GGDEF Y EAL EN EL METABOLISMO DE BACTERIAS

Acetobacter xylinum

La función de la mayoría de las proteínas que poseen los dominios GGDEF y EAL aún se desconoce, sin embargo, en la bacteria productora de celulosa *A. xylinum* se comprobó experimentalmente que las proteínas DGC y PDEA, que tienen estos dominios, son enzimas que sintetizan y degradan el c-di-GMP respectivamente.⁴⁶

La síntesis de celulosa en *A. xylinum* está a cargo de la enzima celulosa sintasa la cual tiene dos subunidades, una subunidad catalítica que se encarga de sintetizar el polímero de celulosa a partir de UDP-glucosa, y una subunidad de unión a c-di-GMP, también llamada proteína de unión a c-di-GMP (CDGBP). Ambas subunidades están ancladas en la membrana citoplasmática y se asocian a otras dos proteí-

nas (AcsA y AcsD) que se localizan en la membrana externa y que se requieren para el ensamblaje y la excreción del polímero de glucosa.²⁴

En *A. xylinum* la concentración celular de c-di-GMP se estima que es de 5 a 10 μ M; aproximadamente, la misma concentración del AMPc pero 100 veces más baja que la de GMPc. Sin embargo, muy poco del c-di-GMP se encuentra libre en la célula, pues alrededor del 80% de este compuesto se encuentra unido a la proteína CDGBP para evitar así su degradación enzimática llevada a cabo por la proteína PDEA1.^{36,51}

En *A. xylinum*, la concentración intracelular de c-di-GMP se determina por la acción opuesta de tres enzimas diguanilato ciclasa (DGC1, DGC2, DGC3) y tres enzimas fosfodiesterasa de diguanilato (PDEA1, PDEA2, PDEA3), las cuales se codifican en tres operones independientes. Cada una de las tres proteínas DGC (codificadas por los genes *dgc1*, *dgc2*, *dgc3*) y las tres proteínas PDEA (codificadas por los genes *pdeA1*, *pdeA2* y *pdeA3*), muestran un arreglo de dominios

PAS-GGDEF-EAL y un arreglo genético *pdeA-dgc* que sugiere una regulación tipo operón. El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas revela un alto grado de identidad estructural en cada grupo de isoenzimas. Las seis proteínas contienen los dominios GGDEF y EAL en las regiones de carboxilo terminal (C-terminal) y los dominios sensores en el amino terminal (N-terminal). Algunos estudios realizados en mutantes en los tres operones muestran que hay una jerarquía funcional en donde el operón *cdg1* es la fuente del 80% de la actividad enzimática de DGC y PDEA y los operones *cdg2* y *cdg3* contribuyen con el 15 y el 5 % de la actividad, respectivamente.^{36-38,46} Aunque se ha demostrado que las proteínas DGC y PDEA tienen actividades opuestas, sus dominios son prácticamente idénticos por lo que el sitio catalítico tanto para la síntesis como para el rompimiento del c-di-GMP permanece sin determinarse.

Para probar la hipótesis de que los dominios GGDEF en diferentes proteínas tienen actividad de diguanilato ciclasa, se realizaron experimentos de complementación genética empleando tres genes distintos que codifican para proteínas cuyo único elemento en común es el dominio GGDEF. Los genes empleados fueron *celR2* (*Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*), *dgc1* (*Acetobacter xylinum*) y *yhcK* (*Escherichia coli*) los cuales fueron clonados en vectores de expresión y utilizados para transformar una cepa mutante *celR2* (que codifica para una c-di-GMP sintasa) de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* deficiente en la producción de celulosa. En los tres casos, la transformación resultó en la recuperación de la capacidad de producir celulosa. Estos datos genéticos sugirieron que las proteínas que contienen el dominio GGDEF, poseen actividad de diguanilato ciclasa y que este dominio es el responsable de dicha actividad.^{3,39}

Caulobacter crescentus

Caulobacter crescentus es la bacteria en la cual se ha estudiado con mayor detalle el papel del dominio GGDEF. En esta bacteria se ha descrito un mecanismo de diferenciación celular en el cual participa la proteína PleD que contiene un dominio GGDEF. Esta proteína la codifica el gen *pleD* y se requiere para la diferenciación característica de células flageladas (móviles) a células no flageladas (no móviles).^{2,21}

El desarrollo polar es una manifestación visual de la diferenciación celular en *C. crescentus*. Un polo de la célula pre-divisional acarrea un único flagelo o pili tipo IV, mientras que el otro polo lleva un apéndice, de tal forma que, la división celular produce dos células especializadas, una célula planctónica móvil y otra célula no-móvil capaz de adherirse a superficies para formar monocapas de células.¹

Algunos estudios recientes indican que los sistemas de transducción de señales de dos componentes están involucrados en el desarrollo polar de *C. crescentus*. Los genes *pleC*,

divJ y *divL* codifican para sensores histidina cinasas y los genes *divK* y *pleD* codifican para reguladores transcripcionales. Hay evidencias que indican que PleC y DivJ son las histidinas cinasas que fosforilan a PleD para regular la actividad de control flagelar y la pérdida de la motilidad y formación del apéndice durante la transición de célula móvil a célula no móvil. PleD controla negativamente la función flagelar en su conformación activa fosforilada (PleD-P) y las cinasas DivJ y PleC son las responsables del control de la pérdida y de la ganancia de motilidad en el ciclo celular de *C. crescentus* mediante la modulación de la actividad de PleD.¹ Ciertas mutaciones en PleD producen defectos polares pleiotrópicos que incluyen hipermotilidad y una falla para sintetizar el flagelo y elongar la prosteca en la diferenciación. PleD tiene en su extremo N-terminal dos dominios receptores (D1 y D2) contiguos y en el C-terminal tiene un dominio GGDEF. Se ha demostrado que una proteína híbrida que contiene el dominio GGDEF de un ortólogo de PleD, la proteína WspR de *Pseudomonas fluorescens*, y los dominios D1 y D2 de la proteína PleD de *C. crescentus* es funcional ya que es capaz de complementar la deficiencia del apéndice en una cepa mutante en *pleD*. Esto sugiere que las proteínas que poseen dominios GGDEF no solamente se requieren para la síntesis de exopolisacáridos sino que participan en modular las superficies de la célula y favorecen las interacciones célula-célula que conllevarán a la formación de biopelículas, es decir a una forma de vida basada en comunidades multicelulares complejas.²

Un análisis de la localización de PleD mostró que ésta se distribuye en toda la célula móvil pero durante la diferenciación celular, su forma activa (fosforilada) se concentra en el polo de la prosteca en la célula no-móvil.³⁰ Una proteína PleD constitutivamente activa produce células con la prosteca elongada y con un efecto negativo dominante en la motilidad.²

El hecho de que el dominio GGDEF de *P. fluorescens* pudiera complementar la actividad de PleD de *C. crescentus* sugirió que esta proteína podría tener una actividad de diguanilato ciclasa intrínseca y así sintetizar c-di-GMP el cual podría actuar como un posible segundo mensajero. Un ensayo con la proteína PleD purificada mostró que tiene actividad de diguanilato ciclasa y esta actividad es independiente del estado de fosforilación de la proteína, aunque en su forma activa (fosforilada) tiene mayor actividad de ciclasa. En contraste, la actividad de diguanilato ciclasa de la proteína Rrp1 de *Borrelia burgdorferi* requiere de la fosforilación de la proteína.³⁹ Por otro lado la proteína PleD no mostró actividad de fosfodiesterasa.³⁰

El análisis cristalográfico de la proteína PleD permitió proponer un posible mecanismo de catálisis en el cual la reacción de condensación de dos moléculas de GTP para formar c-di-GMP requiere que la proteína forme dímeros. El análisis enzimático mostró que existe una inhibición alostérica por producto, esto es, la actividad de PleD se in-

hibe cuando se rebasa un límite máximo en la concentración c-di-GMP. Esto sugiere que debe haber una regulación muy fina en la actividad de las proteínas que sintetizan y degradan este dinucleótido.⁶

Salmonella enterica serovar *Typhimurium*

La agregación celular es un comportamiento común en las bacterias patógenas y en los aislados ambientales en ciertas etapas del desarrollo, lo que les ofrece ventajas ecológicas. Las bacterias se benefician de la cooperación multicelular para acceder a los recursos que no pueden utilizar efectivamente como células individuales. En *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* el comportamiento multicelular ocurre como consecuencia de cambios en la composición de la matriz extracelular. Estos cambios se producen al sintetizar fimbria agregativa, celulosa o ambas sustancias y dan lugar a tres morfotipos: El morfotipo **rdar** aparece cuando *Salmonella* produce fimbria agregativa y celulosa, se caracteriza por colonias de apariencia rugosa y de color rojo en placas de medio suplementado con el colorante rojo congo. El morfotipo **bdar** se produce cuando se sintetiza únicamente fimbria agregativa y da lugar a colonias lisas de color café en placas con rojo congo. Finalmente, el morfotipo **pdar** que da origen a colonias lisas y de color rosa en placas con rojo congo, es característico de células que únicamente producen celulosa.⁵⁴

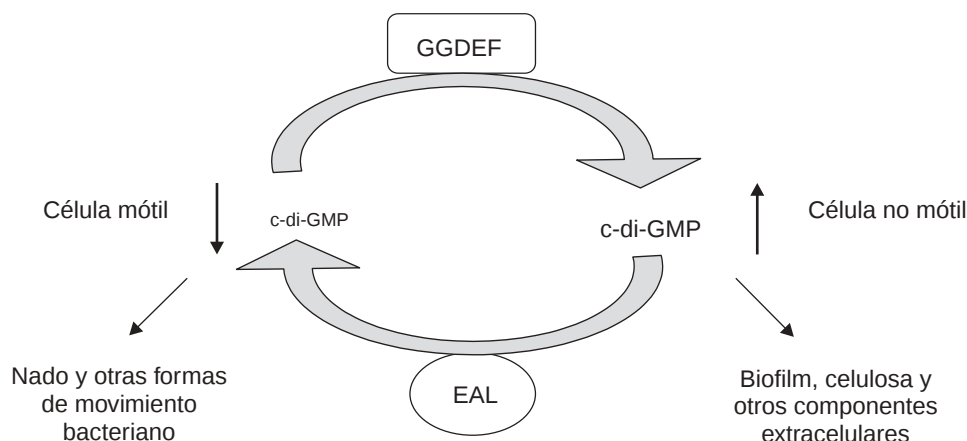
AdrA es una proteína de 371 aminoácidos con un extremo amino que contiene cuatro regiones transmembranales y un dominio GGDEF de 180 aminoácidos en el extremo carboxilo.³⁴ Una inserción en el gen que la codifica provocó el cambio del morfotipo **rdar** al morfotipo **bdar**, es decir, al morfotipo en el cual sólo se sintetiza fimbria agregativa y no celulosa.⁵⁴ Esta observación sugirió de que la proteína AdrA podría participar en la regulación de la producción de celulosa en *S. typhimurium*.⁵⁴

En *S. typhimurium* la celulosa es un componente importante para la formación de biopelículas.^{44,54} Un análisis de complementación de una cepa de *S. typhimurium* que no forma biopelículas con un banco genético de una cepa productora de biopelículas llevó a la identificación de un grupo de siete genes capaces de restaurar la formación de biopelículas. Todos ellos codifican proteínas que comparten el dominio GGDEF. Estas proteínas se nombraron Gcp (por la designación en inglés *GGDEF domain containing protein*). Por otro lado, una mutante Δ adrA se transformó sistemáticamente con cada uno de los genes *gcp* expresados en un plásmido y el resultado fue que no todas las proteínas Gcp restauraron la producción de celulosa en esta mutante. Dos proteínas, GcpA y MlrA fueron las que corrigieron en mayor grado la deficiencia en la síntesis de celulosa. El único elemento en común entre estas proteínas es el domi-

nio GGDEF al igual que con el resto de las proteínas Gcp. Una de estas proteínas, GcpE, no pudo complementar a la mutante en *adrA* y su sobreproducción eliminó la producción de celulosa en una cepa silvestre; por el contrario, una mutación en el gen *gcpE* incrementó la producción de celulosa. La proteína GcpE además del dominio GGDEF contiene un dominio EAL por lo que se sugiere que esta proteína podría actuar como una fosfodiesterasa que cataliza la degradación de c-di-GMP a 5'GMP como la proteína PDEA1 de *A. xylinum*. Por lo anterior y dado que existen varias proteínas con los dominios GGDEF y EAL en los genomas bacterianos, se sugiere que existe un orden jerárquico en la utilización de proteínas GGDEF para la transducción de señales.¹⁴

Por otro lado, las proteínas AdrA y YhjH de *S. typhimurium*, se usaron como un sistema modelo para estudiar la relación funcional entre los dominios GGDEF y los dominios EAL con el metabolismo del c-di-GMP. Las células que sobre-expresan AdrA, elevan su producción de celulosa y en ellas se puede detectar, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MALDI-TOF), la presencia de c-di-GMP. Los niveles de expresión de AdrA correlacionaron con el incremento de c-di-GMP. Además, las cepas que acarrean mutaciones que modifican el dominio GGDEF (G288A y G289A) de AdrA no produjeron niveles de c-di-GMP detectables.⁴² La proteína YhjH contiene únicamente un dominio EAL. La sobreproducción de esta proteína disminuyó la síntesis de celulosa y la concentración de c-di-GMP producidas por AdrA. Una mutante YhjH afectada en el residuo de glutamato conservado del dominio EAL (E136A) no disminuyó la producción de celulosa ni alteró los niveles de c-di-GMP generados por AdrA. La sobre-expresión de la fosfodiesterasa YhjH en *S. typhimurium* provoca que se incrementen la motilidad y el nado en agar suave, mientras que la diguanilato ciclasa AdrA los disminuyen. Estos resultados sugieren fuertemente que los dominios GGDEF y EAL están directamente involucrados en la síntesis y en la degradación del c-di-GMP (Fig. 3).⁴²

Por otro lado, en una búsqueda de los genes implicados en la virulencia de *S. typhimurium* mediante mutagénesis por inserción de transposón se encontró al gen *cdgR* (por *c-di-GMP regulator*), que codifica para una proteína capaz de disminuir los niveles celulares de c-di-GMP y que tiene únicamente un dominio EAL.¹⁷ La proteína CdgR confiere resistencia al estrés oxidativo pues mutantes del gen *cdgR* son más susceptibles a la acción bactericida del H₂O₂ que la cepa silvestre respectiva o que una cepa complementada con el gen *cdgR* silvestre. La proteína CdgR también participa en la virulencia de *S. typhimurium* al incrementar su capacidad para matar macrófagos.¹⁷



Vibrio cholerae

Vibrio cholerae es una bacteria patógena que puede cambiar reversiblemente de un estado virulento a uno no virulento. En el fenotipo virulento la bacteria está embebida en una red de polisacáridos extracelulares que le confieren a la colonia una apariencia rugosa y que favorece la formación de la biopelícula. En el fenotipo no virulento se abate la síntesis de exopolisacáridos por lo que las colonias muestran una apariencia lisa.³³

En una búsqueda de los determinantes que intervienen en el cambio reversible de células rugosas a lisas y viceversa, se encontró a la proteína RocS que es una proteína que tiene los dominios GGDEF y EAL. Las mutantes afectadas en el gen *rocS* no son capaces de cambiar al fenotipo rugoso y presentan deficiencias en la motilidad por lo que se sugiere que RocS tiene un papel importante en la regulación de los determinantes de virulencia de esta bacteria. El análisis de la secuencia de la proteína RocS mostró que tiene mayor similitud con la enzima diguanilato ciclasa (DGC1) que con la fosfodiesterasa (PDEA1) de *A. xylinum* ya que estas proteínas DGC1 y PDEA1 tienen también los dominios GGDEF y EAL.^{33,46} La proteína RocS podría regular la producción de exopolisacáridos, la formación de las biopelículas y la virulencia a través del segundo mensajero c-di-GMP.³³

Por otro lado, la virulencia de *V. cholerae* está regulada por otros factores además de la proteína RocS. Entre estos factores se encuentran el sistema de tres componentes VieSAB codificadas en el operón *vieSAB* en donde VieS es una histidina cinasa mientras que VieA y VieB son dos reguladores de respuesta que participan en la regulación transcripcional del operón *ctxAB* que codifica para las subunidades A y B de la toxina de cólera (CT). Probablemente es una regulación indirecta pues los niveles de *toxT*, el gene de uno de los reguladores

transcripcionales del operón *ctxAB*, disminuyen en una cepa Δ *vieSAB*.⁴⁹

VieA es una proteína que porta un dominio EAL, pero que además tiene las características propias de los reguladores de respuesta típicos de los sistemas de dos componentes: un residuo de aspartato fosforilable y un dominio de unión a DNA (*helix-turn-helix*, HTH).¹³

Esta proteína también regula indirectamente la producción de los exopolisacáridos en *V. cholerae*. Los operones *vpsA-D* y *vpsL-Q* codifican para la síntesis de los exopolisacáridos cuya activación transcripcional depende del factor VpsR. Por su parte, la proteína VieA disminuye los niveles intracelulares de c-di-GMP mediante la actividad de fosfodiesterasa que le confiere el dominio EAL. Esta disminución provoca que los niveles de transcrito del gen *vpsR* bajen y por tanto disminuya también la transcripción de los genes *vps* y la síntesis de exopolisacáridos que se requieren para la formación de biopelículas.⁴⁸

El cambio en concentración de c-di-GMP es una consecuencia de la disminución en la actividad de fosfodiesterasa del dominio EAL de VieA o del aumento de la actividad de ciclasa de una o más proteínas GGDEF. Se propone que los genes *vps* responden al incremento en la concentración de c-di-GMP a través de algún factor de transcripción que percibe este compuesto y regula la expresión del gen *vpsR*.⁴⁸

Por otro lado, la proteína MbaA (por la designación en inglés *maintenance of biofilm architecture*) es otra de las múltiples proteínas que presentan los dominios GGDEF y EAL en *V. cholerae*. Esta proteína participa en la maduración y el mantenimiento de la arquitectura de la biopelícula en esta bacteria. La mutación Δ *mbaA* no afecta las etapas tempranas de la formación de la biopelícula pero provoca una acumulación del material extracelular que resulta en una formación de una biopelícula de arquitectura distinta a la típica de pilares de células separados por canales. Aunque no se ha demos-

Figura 3. Comportamiento bacteriano a niveles bajos y altos de c-di-GMP. El recambio de c-di-GMP está mediado por los dominios GGDEF y EAL. Modificado de Sim, et al.⁴²

trado, los dominios presentes en la proteína MbaA sugieren que esta proteína podría regular las concentraciones del segundo mensajero c-di-GMP, posiblemente requerido para el mantenimiento de la matriz extracelular en las biopelículas de *V. Cholerae*.⁵

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que habita en una amplia variedad de ambientes entre los que se incluye el suelo, el agua, los tejidos de plantas y los tejidos de mamíferos, entre otros. En los humanos, *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista que se establece en forma de biopelícula y afecta a individuos inmunocomprometidos o que sufren de fibrosis quística.⁴³

Del esputo de pacientes con fibrosis quística se pueden aislar variantes de *P. aeruginosa* que presentan resistencia al tratamiento con antibióticos y que comparadas con células no resistentes presentan una morfología distinta. Las células resistentes a los antibióticos forman colonias pequeñas y de apariencia rugosa (RSCV por la designación en inglés *rough small-colony variant*). En contraste, las células sensibles forman colonias lisas de mayor tamaño. Las células RSCV forman agregados de células en medio de cultivo líquido, y biopelículas con mayor contenido de biomasa y de arquitectura distinta a las que pueden formar las células sensibles.⁹

P. aeruginosa es capaz de cambiar del fenotipo RSCV al fenotipo silvestre de manera transitoria, lo que le permite a la bacteria modificar su resistencia a antibióticos. Estos cambios están regulados por la proteína PvrR, un regulador de respuesta del tipo de los sistemas de dos componentes, homólogo a la proteína VieA de *V. cholerae* en todos sus dominios incluyendo el dominio EAL.⁹ La presencia del dominio EAL sugiere que la disminución de los niveles de c-di-GMP podría ser un factor determinante en estos procesos y potencialmente un arma importante para el tratamiento de infecciones por esta bacteria.^{8,16}

Por otro lado, la autoagregación de *P. aeruginosa* provoca la formación de colonias rugosas y está relacionada con la adhesión de las células en el proceso de formación de biopelículas. Esta agregación la regula la proteína WspR, un factor transcripcional del tipo regulador de respuesta de sistemas de dos componentes que tiene un dominio GGDEF.⁷ La función opuesta sugerida para los dominios GGDEF y EAL es consistente con la actividad mostrada por la proteína WspR (GGDEF) para inducir la autoagregación y la actividad de la proteína PvrR (EAL) para reprimirla.⁸

P. aeruginosa tiene 33 proteínas con el dominio GGDEF y 21 proteínas con el dominio EAL¹³ sin embargo se conoce la función de sólo algunas de estas proteínas. Por ejemplo, la proteína FimX tiene ambos dominios y se localiza en un polo de la célula. A esta proteína se le ha relacio-

nado con la regulación del movimiento tipo "twitching", que es un movimiento provocado por la extensión y retracción del pili requerido para la formación de biopelículas.¹⁹

Otras bacterias

Con la publicación constante de genomas bacterianos secuenciados en su totalidad se han identificado cada vez más proteínas con dominios GGDEF y EAL. De la mayoría de ellas se desconoce su función pero se les ha ido involucrando en diferentes procesos bacterianos. Por ejemplo, el caso de las proteínas HmsT y HmsP de *Yersinia pestis*. Esta bacteria tiene la capacidad de formar colonias teñidas de color café verdoso o rojo al unir hemina o rojo congo (RC) respectivamente (fenotipo Hms⁺), a temperaturas menores a 34°C. A mayor temperatura las colonias son siempre de color blanco.³²

Dentro de los genes involucrados en la regulación del fenotipo Hms⁺ se encuentran las proteínas HmsP y HmsT. La primera de estas proteínas, HmsP codifica para una fosfodiesterasa de c-di-GMP pues contiene un dominio EAL que le confiere dicha actividad.⁴ Mutantes en *hmsP* forman colonias rojas en medio suplementado con RC a 26°C y a 37°C y la complementación con el gen *hmsP* provoca la formación de colonias blancas a ambas temperaturas. Por otro lado, la proteína HmsT codifica para una diguanilato ciclasa, puesto que tiene un dominio GGDEF en su estructura capaz de sintetizar c-di-GMP.⁴¹ La formación de biopelícula en *Y. pestis* depende de los genes *hms*. Esta bacteria forma biopelícula a 26°C pero no a 37°C. Cuando se sobreexpresa el gen *hmsT* o hay una mutación en el gen *hmsP*, la formación de biopelícula se incrementa considerablemente por lo que se sugiere que su formación depende de la concentración de c-di-GMP.²⁵

Un caso muy interesante es el de la bacteria patógena Gram positiva *Staphylococcus aureus* que a diferencia de la mayoría de las especies bacterianas, tiene únicamente una proteína con el dominio conservado GGDEF y otra proteína con un dominio GGDEF modificado. Se ha demostrado que la adición de c-di-GMP a una concentración de 200µM, a *S. aureus*, trastorna sus interacciones célula-célula puesto que disminuye su capacidad de agregación, de formación de cúmulos de células y de formación de biopelículas.²²

Se ha sugerido que el c-di-GMP podría formar complejos y secuestrar las moléculas que se requieren para la formación de las biopelículas o que el c-di-GMP podría unirse a receptores de membrana bloqueando señales externas, o bien, podría unirse a factores de transcripción que modifiquen la expresión de genes requeridos para la formación de biopelículas. Este hallazgo es relevante en el aspecto clínico pues el c-di-GMP ofrece una alternativa en el control de infecciones debidas a esta bacteria patógena ya que si se usa como agente terapéutico pudiera inhibir la formación de biopelículas y, por tanto, su establecimiento en células humanas y animales.²²

La síntesis y la degradación de c-di-GMP por proteínas que tienen los dominios GGDEF y/o EAL se ha demostrado en muchas otras bacterias, por ejemplo en: *Thermotoga*, *Deinococcus*, cianobacterias, espiroquetas y otras α y γ -proteobacterias; sin embargo el papel fisiológico en el que participa el c-di-GMP en ellas no se conoce.³⁹

CONCLUSIONES

Los análisis *in silico* de las secuencias reportadas de los genomas bacterianos han permitido la identificación de nuevos dominios proteicos que permiten asignar posibles papeles a proteínas de función desconocida. El descubrimiento de que los dominios GGDEF y EAL participan en el recambio de las concentraciones celulares de c-di-GMP, una molécula que repercute en varios procesos bacterianos tales como la síntesis de celulosa, la formación de biopelículas, la diferenciación celular y virulencia, abre una nueva frontera en el estudio de la transducción de señales de bacterias pues el c-di-GMP puede transducir numerosas señales en respuesta a diversos estímulos, tal como lo hace el GMPc en vertebrados.

Sin embargo, el estudio de esta nueva vía de transducción de señales se encuentra en sus etapas más tempranas pues quedan muchas preguntas por resolver para poder establecer los mecanismos en los cuales el c-di-GMP actúa como segundo mensajero.

Dada la reiteración de los dominios GGDEF y EAL en una misma especie bacteriana surge el interés por entender esta aparente redundancia de funciones. Probablemente existe algún tipo de jerarquía y diferencia en las actividades enzimáticas que provocan la utilización de una u otra proteína.

Por otro lado, establecer a qué proteínas o sustratos se une el c-di-GMP ayudará a elucidar los mecanismos por los cuales actúa. Los candidatos más viables para la acción del c-di-GMP como segundo mensajero son proteínas de membrana, reguladores transcripcionales, histidinas cinasas y canales iónicos, entre otros. Finalmente, el uso de herramientas moleculares globales como los análisis del transcriptoma y del proteoma para analizar la transcripción de los genes y la síntesis de proteínas reguladas por la concentración de c-di-GMP dará pistas importantes para abordar estos cuestionamientos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido apoyado por los proyectos IN205200 y IN207703 de PAPIIT INAM; J33369 y 42580 de CONACYT México. M.M.M.-O. es becaria de CONACYT y DGEPI-UNAM. A la Dra. G. Soberón y al S. Encarnación por los comentarios al manuscrito.

REFERENCIAS

1. Aldridge, P. and U. Jenal. 1999. Cell cycle-dependent degradation of a flagellar motor component requires a novel-type response regulator. *Mol Microbiol* 32:379-391.
2. Aldridge, P., R. Paul, P. Goyer, P. Rainey, and U. Jenal. 2003. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 47:1695-1708.
3. Ausmees, N., R. Mayer, H. Weinhouse, G. Volman, D. Amikam, M. Benziman, and M. Lindberg. 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 204:163-167.
4. Bobrov, A., O. Kirillina, and R. Perry. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 247:123-130.
5. Bomchil, N., P. Watnick, and R. Kolter. 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol* 185:1384-1390.
6. Chan, C., R. Paul, D. Samoray, N. Amiot, B. Giese, U. Jenal, and T. Schirmer. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17084-17089.
7. D'Argenio, D., M. Calfee, P. Rainey, and E. Pesci. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184:6481-6489.
8. D'Argenio, D. and S. Miller. 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150:2497-2502.
9. Drenkard, E. and F. Ausubel. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416:740-743.
10. Egli, M., R. Gessner, L. Williams, G. Quigley, G. van der Marel, J. van Boom, A. Rich, and C. Frederick. 1990. Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3235-3239.
11. Galperin, M. 2005. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* 6:552-567.
12. Galperin, M., T. Gaidenko, A. Mulkidjanian, M. Nakano, and C. Price. 2001. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett* 205:17-23.
13. Galperin, M., N. Nikolskaya, and E. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203:11-21.
14. García, B., C. Latasa, C. Solano, F. García-del Portillo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 54:264-277.
15. Gilles-Gonzalez, MA. 2001. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* 51:165-173.
16. Haussler, S. 2004. Biofilm formation by the small colony variant phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 6:546-551.
17. Hisert, K., M. Maccoss, M. Shiloh, K. Darwin, S. Singh, R. Jones, S. Ehrh, Z. Zhang, B. Gaffney, S. Gandotra, D. Holden, D. Murray, and C. Nathan. 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defense and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* 56:1234-1245.
18. Hoch, J. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3:165-170.
19. Huang, B., C. Whitchurch, and J. Mattick. 2003. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:7068-7076.
20. Iyer, L., V. Anantharaman, and L. Aravind. 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* 4:Publicación en línea.

21. Jacobs, C., D. Hung, and L. Shapiro. 2001. Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4095-4100.
22. Karaolis, D., M. Rashid, R. Chythanya, W. Luo, M. Hyodo, and Y. Hayakawa. 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1029-1038.
23. Kawai, R., R. Nagata, A. Hirata, and Y. Hayakawa. 2003. A new synthetic approach to cyclic bis(3'→5')diguanylic acid. *Nucleic Acids Res Suppl* 3:103-104.
24. Kimura, S., H. Chen, I. Saxena, R. Brown Jr, and T. Itoh. 2001. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 183:5668-5674.
25. Kirillina, O., J. Fetherston, A. Bobrov, J. Abney, and R. Perry. 2004. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 54:75-88.
26. Liaw, Y., Y. Gao, H. Robinson, G. Sheldrick, L. Sliedregt, G. van der Marel, J. van Boom, and A. Wang. 1990. Cyclic diguanylic acid behaves as a host molecule for planar intercalators. *FEBS Lett* 264:223-227.
27. Magnusson, L., A. Farewell, and T. Nystrom. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13:236-242.
28. Merkel, T., C. Barros, and S. Stibitz. 1998. Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 180:1682-1690.
29. Nikolskaya, A., A. Mulikdjanian, I. Beech, and M. Galperin. 2003. MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* 5:11-16.
30. Paul, R., S. Weiser, N. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18:715-727.
31. Pei, J. and N. Grishin. 2001. GGDEF domain is homologous to adenyl cyclase. *Proteins* 42:210-216.
32. Perry, R., A. Bobrov, O. Kirillina, H. Jones, L. Pedersen, J. Abney, and J. Fetherston. 2005. Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *J Bacteriol* 186:1638-1647.
33. Rashid, M., C. Rajanna, A. Ali, and D. Karaolis. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* 227:113-119.
34. Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark, and J. Reinkoster. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* 36:10-23.
35. Ross, P., Y. Aloni, H. Weinhouse, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, and M. Benziman. 1986. Control of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, a unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydr Res* 49:101-117.
36. Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55:35-58.
37. Ross, P., R. Mayer, H. Weinhouse, D. Amikam, Y. Huggirat, and M. Benziman. 1990. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J Biol Chem* 265:18933-18943.
38. Ross, P., H. Weinhouse, Y. Aloni, D. Michaeli, P. Weinberger-Ohana, R. Mayer, S. Braun, E. de Vroom, G. A. van der Marel, J. van Boom, and M. Benziman. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325:279-281.
39. Ryjenkov, D., M. Tarutina, O. Moskvina, and M. Gomelsky. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* 187:1792-1798.
40. Shu, C., L. Ulrich, and I. Zhulin. 2003. The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci* 28:121-124.
41. Simm, R., J. Fetherston, A. Kader, U. Romling, and R. Perry. 2005. Phenotypic Convergence Mediated by GGDEF-Domain-Containing Proteins. *J Bacteriol* 187:6816-6823.
42. Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz, and U. Romling. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53:1123-1134.
43. Singh, P., A. Schaefer, M. Parsek, T. Moninger, M. Welsh, and E. Greenberg. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407:762-764.
44. Solano, C., B. García, J. Valle, C. Berasain, J. Ghigo, C. Gamazo, and I. Lasa. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43:793-808.
45. Stulke, J. and W. Hillen. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2:195-201.
46. Tal, R., H. Wong, R. Calhoon, D. Gelfand, A. Fear, G. Volman, R. Mayer, P. Ross, D. Amikam, H. Weinhouse, A. Cohen, S. Sapir, P. Ohana, and M. Benziman. 1998. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180:4416-4425.
47. Tatusov, R., D. Natale, I. Garkavtsev, T. Tatusova, U. Shankavaram, B. Rao, B. Kiryutin, M. Galperin, N. Fedorova, and E. Koonin. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29:22-28.
48. Tischler, A. and A. Camilli. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 53: 857-869.
49. Tischler, A., S. Lee, and A. Camilli. 2002. The *Vibrio cholerae* *vieSAB* locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J Bacteriol* 184:4104-4113.
50. Ulrich, L., E. Koonin, and I. Zhulin. 2005. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol* 13:52-56.
51. Weinhouse, H., S. Sapir, D. Amikam, Y. Shilo, G. Volman, P. Ohana, and M. Benziman. 1997. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett* 416:207-211.
52. Zhang, Z., B. Gaffney, and R. Jones. 2004. c-di-GMP displays a monovalent metal ion-dependent polymorphism. *J Am Chem Soc* 126:16700-16701.
53. Zhulin, I., A. Nikolskaya, and M. Galperin. 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol* 185:285-294.
54. Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz, and U. Romling. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452-1463.

Correspondencia:

Jorge Membrillo-Hernández

Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular.
Departamento de Biología Molecular y
Biotecnología.
Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-228. Ciudad Universitaria. 04510.
México, D.F. Tel.- (55) 56 22 38 40
Fax.- (55) 56 22 38 55
E-mail: jmh@biomedicas.unam.mx