



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del Regulón CtrA en *Rhodobacter sphaeroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José de Jesús Hernández Valle

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Luis Servín González
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.](#)

Dr. Fidel Alejandro Sanchez Flores
[Instituto de Biotecnología, UNAM.](#)

Ciudad de México. Enero, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi comité tutorial: Dra. Laura Camarena, Dr. Luis Servín y Dr. Alejandro Sanchez Flores por su guía, observaciones e ideas otorgadas para el desarrollo de este proyecto, así como por sus invaluable consejos personales.

A mi comité sinodal, por sus valiosas aportaciones para mejorar este manuscrito, así como las ideas brindadas para enriquecer este proyecto.

A la Dra. Clelia Domenzain, a la Q.F.B. Aurora Osorio y al Dr. Javier de la Mora por el apoyo técnico facilitado para la elaboración de este proyecto.

A la Unidad de Secuenciación Masiva de la UNAM y en especial al Dr. Alejandro Sanchez Flores, Dr. Ricardo Grande y a la MC Verónica Jimenez Jacinto por llevar a cabo los procesos de secuenciación masiva y procesamiento de datos, así como por el apoyo técnico para el análisis de expresión diferencial.

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por el apoyo en la obtención en las micrografías electrónicas.

A la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, particularmente al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por el apoyo en la obtención de las micrografías confocales.

Al Dr. Diego González-Halphen por el apoyo en la obtención de los espectros de absorción.

A la Dra. Laura Camarena, Dr. Georges Dreyfus, Dra. Clelia Domenzain, Dr. Sebastián Poggio,

Dr. Javier de la Mora y a la QFB Teresa Ballado por sus enriquecedores comentarios durante las discusiones de este trabajo.

A mis queridos compañeros de laboratorio por sus valiosos comentarios académicos y por los buenos momentos compartidos.

A la Dra. Laura Camarena, por su inalcanzable confianza y apoyo inigualables.

Al CONACyT por otorgarme una beca para poder realizar mis estudios de maestría.

El apoyo PAEP 2017 se empleó para la asistencia al congreso BLAST XIV.

Este proyecto fue financiado por DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN204317) y CONACyT (CB2014-235996).

A mis padres: Irma y Chuy,
por ser mis amigos, mis socios
y compañeros de aventura.

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Sistemas de dos componentes en bacterias	3
Generalidades de CtrA	5
Regulación de la actividad de CtrA en <i>Caulobacter crescentus</i>	11
Generalidades de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
Materiales y métodos	21
Resultados	36
Regulón CtrA en <i>R. Sphaeroides</i>	36
Identificación bioinformática de motivos de unión a CtrA	41
Mapa de calor del regulón CtrA	43
Clasificación funcional del regulón CtrA	46
Validación de la regulación transcripcional en genes seleccionados	48
CtrA regula la flotabilidad mediada por vesículas de gas	49
<i>Determinación de la presencia de vesículas de gas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)</i>	49
<i>Generación de la proteína fusión GvpA-Tcys</i>	50
<i>Ensayos de flotabilidad</i>	52
CtrA regula negativamente la producción de pigmentos fotosintéticos	58
La formación de biopelícula es dependiente de CtrA	61
Discusión	65
Regulón CtrA en <i>R. Sphaeroides</i>	65

CtrA regula positivamente la flotabilidad mediada por vesículas de gas (VG)	71
CtrA es un regulador negativo de fotosíntesis	73
CtrA promueve la formación de biopelícula	77
Modelo de la regulación de CtrA en la fisiología de <i>R. Sphaeroides</i>	80
Conclusiones	83
Perspectivas	84
Anexos	85
1. Fotosíntesis en <i>R. Sphaeroides</i>	85
2. Vesículas de gas y flotabilidad	89
3. Biofilm y respuesta sensora de quórum	92
4. Colocalización de vesículas de gas con el flagelo Fla2	96
5. Observación de las VG en la cepa AM1 crecida en ensayo de flotabilidad	98
6. Espectros de absorción de pigmentos fotosintéticos de las cepas AM1 y AM1 pRK415	99
7. Resultados del análisis de expresión diferencial	100
8. Identificación de posibles sitios de unión de CtrA	107
Referencias	115

Resumen

CtrA es un regulador de respuesta ampliamente representado en las α -Proteobacterias, que en conjunto con la cinasa de histidina CckA y con la fosfotransferasa ChpT forman un sistema de dos componentes híbrido; mediante su unión a secuencias específicas de DNA, CtrA regula la activación y represión transcripcional de genes, dentro de los cuales destacan aquellos involucrados en la división celular, biogénesis flagelar y quimiotaxis.

En la α -Proteobacteria *Rhodobacter sphaeroides*, en las condiciones de crecimiento comunmente utilizadas, el sistema CckA/ChpT/CtrA se encuentra inactivo; sin embargo, en el laboratorio se han aislado mutantes puntuales en CckA que provocan su activación y, en consecuencia, la activación de CtrA, promoviendo la expresión de los genes flagelares *fla2* y del operón quimiotáctico *cheOp1*, tal es el caso de la cepa AM1. A la fecha se desconoce el resto de genes que podrían estar controlados por CtrA en *R. sphaeroides* y si algunos de ellos pudieran dar alguna idea de la forma en la cual este sistema de dos componentes es activado en condiciones naturales. A partir de ello, en el presente trabajo se propuso caracterizar el regulón CtrA en este organismo.

Tras comparar los perfiles transcripcionales de las cepas AM1 y AE1 (AM1 Δ ctrA::aadA), obtenidos mediante RNA-seq, se determinó que el regulón CtrA en *R. sphaeroides* está conformado de 321 genes, de los cuales 239 son regulados de forma positiva mientras que 82 son regulados negativamente. Adicionalmente, una búsqueda *in silico* de motivos de unión a CtrA en las regiones regulatorias de dichos genes sugiere que al menos 115 estarían regulados de forma directa.

Dentro de los grupos de genes regulados por CtrA están: flagelares Fla2, quimiotácticos, vesículas de gas, pili, agente de transferencia de genes (RsGTA), respuesta a estrés, metabolismo de di-GMPc, transporte y metabolismo de sustratos, reguladores transcripcionales, factores sigma, sistema regulatorio CtrA, fotosíntesis y fijación de carbono.

El análisis de algunos procesos celulares permitió confirmar los resultados transcriptómicos obtenidos. Por ejemplo, la evaluación de los complejos fotosintéticos B800, B850 y B875 valida que CtrA es un regulador transcripcional negativo para los genes implicados en su biosíntesis; a su vez, se mostró que la formación de las vesículas de gas es dependiente de CtrA y que dichas estructuras le confieren a *R. sphaeroides* la capacidad de flotar. Adicionalmente se demostró que este organismo es capaz de formar una biopelícula tipo flóculo en el fondo de los viales, siendo tal respuesta también dependiente de dicho regulador de respuesta y del sistema de percepción de quórum.

Finalmente, se propone que un aumento en la densidad poblacional es una de las señales que desencadena la activación del sistema CckA/ChpT/CtrA en la cepa silvestre WS8N de *R. sphaeroides*.

Introducción

Sistemas de dos componentes en bacterias

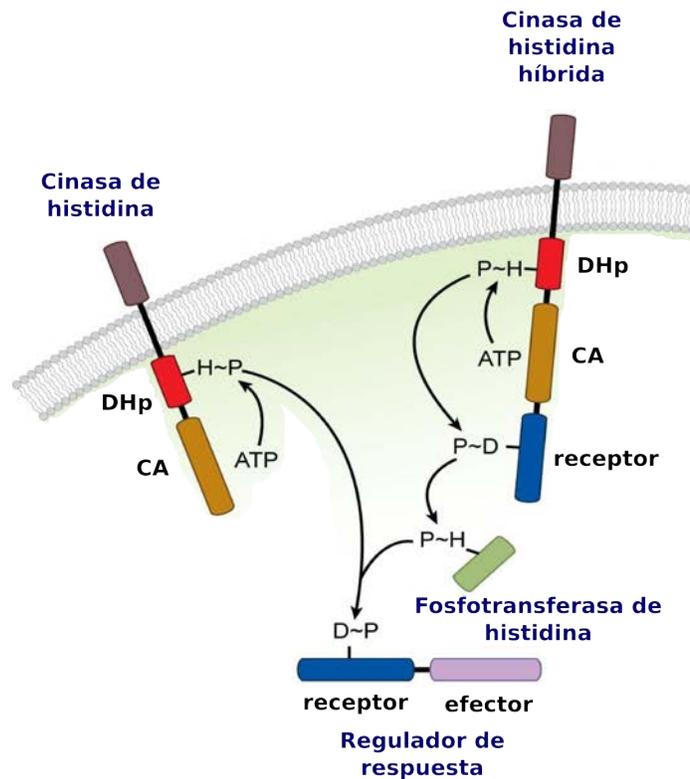
La capacidad de detectar, responder y adaptarse a cambios en las condiciones ambientales determina la supervivencia de los seres vivos. En bacterias, dichas respuestas pueden involucrar alteraciones en la expresión de genes, transición a estados estacionarios de resistencia, así como un desplazamiento direccionado hacia determinados ambientes (Wadhams & Armitage, 2004).

Los sistemas de transducción de señales son vías de procesamiento de información que permiten vincular un estímulo externo a una respuesta celular. A su vez, los sistemas de dos componentes (SDC) conforman un sistema de transducción de señales por el cual las bacterias pueden responder a cambios ambientales o intracelulares; reciben dicho nombre ya que presentan al menos dos proteínas altamente conservadas, una cinasa de histidina dimérica y un regulador de respuesta. Los SDC son también denominados sistemas HAP (Histidine-Aspartate Phosphorelay) por la transferencia de un grupo fosforilo desde la cinasa fosforilada en un residuo de His a un residuo Asp en el regulador de respuesta, el cual llevará a cabo funciones celulares como la regulación transcripcional de genes y la quimiotaxis (Laub & Goulian, 2007; West and Stock, 2001) (Figura 1).

Una cinasa de histidina típica es una proteína integral de membrana homodimérica, en la que cada subunidad consta de dos cruces transmembranales (TM1 y TM2) que flanquean un dominio sensor extracelular. Después del segundo cruce transmembranal (TM2) puede presentar un dominio HAMP (presente en cinasas de histidina, adenilato ciclasas, receptores quimiotácticos MCPs y en fosfatasa), el cual conecta al TM22 con el dominio DHP (dominio de dimerización y que contiene la histidina fosforilable). Adicionalmente, el dominio catalítico y de unión a ATP (CA) se localiza en el extremo C terminal de dicha proteína (Wang, 2012). En un SDC canónico, la activación de la cinasa de histidina

implica la autofosforilación del dominio DHp por el dominio CA, seguida de la transferencia de su grupo fosforilo a su regulador de respuesta (Laub & Goulian, 2007).

Figura 1. Representación esquemática de los sistemas de dos componentes. Del lado izquierdo se muestra un sistema de dos componentes canónico y del lado derecho un sistema de dos componentes híbrido. En ambos casos la autofosforilación de las cinasas de histidina es seguida por la transferencia del grupo fosforilo a un regulador de respuesta o a un dominio receptor dentro de la misma cinasa. En el segundo caso el regulador de respuesta es fosforilado a través de una proteína fosfotransferasa de histidina. Modificado de Laub & Goulian, 2007.



Un regulador de respuesta convencional presenta dos dominios: un dominio receptor (REC), el cual acepta un grupo fosforilo de su cinasa de histidina respectiva y un dominio efector, el cual genera la señal de salida para detonar determinada respuesta celular. El dominio receptor es también conocido como dominio fosforilable o dominio regulatorio, ya que contiene un residuo Asp conservado que es blanco de fosforilación. Dicha modificación postraduccional resulta en cambios conformacionales que son transmitidos al dominio efector para regular su actividad. La mayoría de los reguladores de respuesta son reguladores transcripcionales, cuyo dominio efector es capaz de interactuar con el DNA; sin embargo, algunos presentan dominios con actividad catalítica, capacidad de asociarse a RNA, ligandos y a otras proteínas. De igual forma, existen reguladores de respuesta carentes de dominio

efector, como la proteína quimiotáctica CheY, que es capaz de regular la rotación del flagelo bacteriano por su interacción con la proteína del interruptor del motor flagelar FliM (Wang, 2012).

Se sabe que los reguladores de respuesta de la familia OmpR dimerizan a través del dominio receptor. La fosforilación de OmpR genera cambios conformacionales en dicho dominio, lo que permite la dimerización de dos subunidades del regulador (Wang, 2012).

Existen sistemas de dos componentes híbridos en los que una cinasa de histidina, después de autofosforilarse, transfiere el grupo fosforilo intramolecularmente a un residuo Asp en un dominio receptor tipo regulador de respuesta que no está presente en la cinasa canónica (Figura 1). Posteriormente, el fosforilo es transferido a una fosfotransferasa de histidina y subsecuentemente al regulador de respuesta (Laub & Goulian, 2007). Lo anterior respeta la fosfotransferencia del grupo fosforilo de residuos His a Asp, característica de los sistemas HAP (West and Stock, 2001).

Generalidades de CtrA

CtrA es un regulador de respuesta ampliamente distribuido en las α -proteobacterias (Brilli et al, 2010), que en conjunto con la cinasa de histidina CckA y a la fosfotransferasa ChpT forman un sistema de dos componentes híbrido. CtrA es capaz de interactuar directamente con el DNA, por lo cual puede funcionar como un regulador transcripcional y en *Caulobacter crescentus* como un modulador de la progresión del ciclo celular mediante su unión al origen de replicación (Laub et al, 2002; Pini et al, 2015) (Figura 2).

CtrA pertenece a la familia OmpR de reguladores de respuesta. Presenta un dominio REC en el extremo N terminal y un dominio de interacción con el DNA tipo hélice-giro-hélice alada en el C terminal (Barnett et al, 2001). Es en el dominio REC donde se da la fosforilación de un residuo D conservado lo

que lleva a su activación. Así mismo éste presenta los residuos necesarios para la homodimerización de CtrA.

Se sabe que el extremo C terminal del factor transcripcional OmpR contiene tres alfa hélices y dos láminas beta antiparalelas. Se propone que mediante la alfa hélice 3 se lleva a cabo la interacción con el surco mayor del DNA, que las dos "alas" (regiones que flanquean la región de alfa hélices) son importantes para el reconocimiento del surco menor y que la región comprendida entre las alfa hélices 2 y 3 (loop alfa) interactúa con la subunidad alfa de la RNA polimerasa. Dada la alta similitud de estructura secundaria entre OmpR y CtrA en el C terminal se sugiere que el mecanismo de interacción con el DNA puede ser similar (Barnett et al, 2001).

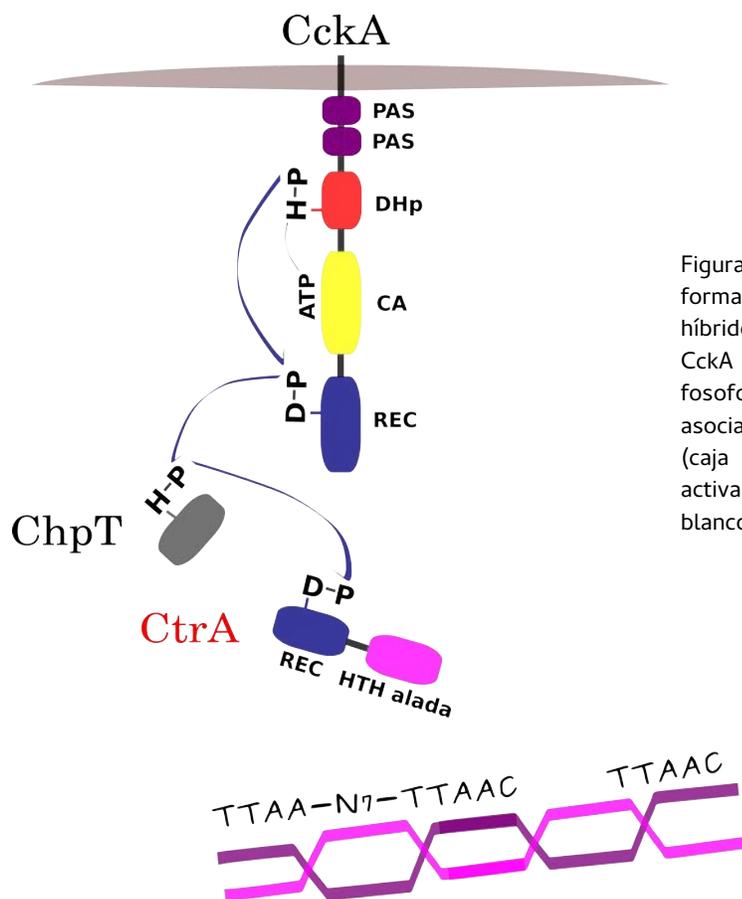


Figura 2. CtrA es un regulador de respuesta que forma parte de un sistema de dos componentes híbrido. Es controlado por la cinasa de histidina CckA y la fosfotransferasa ChpT. Una vez fosforilado por CckA, CtrA es capaz de asociarse a los motivos de DNA TTAAC-N7-TTAAC (caja completa) y TTAAC (caja media), para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco.

La activación de CtrA se da mediante su fosforilación por la proteína transmembranal CckA, a través de la fosfotransferasa ChpT. CckA es una cinasa de histidina híbrida con el potencial de funcionar como fosfatasa. Presenta un extremo N terminal con una región sensora (formada por dos dominios PAS) y un núcleo catalítico [formado por el dominio DHp (dominio de dimerización y que contiene la histidina fosforilable) y por el dominio catalítico CA (que es capaz de asociar ATP y de catalizar la fosforilación)]. Mientras que el extremo C terminal presenta un dominio receptor REC con un residuo Asp fosforilable (Mann et al, 2016) (Figura 2).

Cuando CckA está activa se autofosforila en el residuo de histidina conservado del dominio DHp por acción del dominio CA para después transferir el grupo fosforilo al residuo aspártico del dominio REC intramolecular. Entonces CckA fosforila a la fosfotransferasa ChpT en un residuo histidina, la cual finalmente transfiere el grupo fosforilo a CtrA en su residuo Asp conservado. Como ya se mencionó, CckA tiene la capacidad de funcionar como fosfatasa de CtrA-P cuando no es activada como cinasa, mediante la transferencia de su fosforilo hacia el dominio REC de CckA, a través de ChpT, el cual finalmente es hidrolizado por la misma CckA (Mann et al, 2016).

Una vez fosforilada, CtrA es capaz de asociarse a secuencias específicas de DNA. Sus motivos de unión han sido caracterizados en la α -Proteobacteria *C. crescentus*, identificándose dos secuencias consenso: TTAA-N7-TTAAC (motivo completo o caja completa) y TTAAC (motivo medio ó caja media) (Quon et al, 1996; Laub et al, 2002).

La unión de CtrA a la holoenzima formada por la RNA polimerasa y por el factor sigma 70, activa la transcripción de los genes dependientes de este factor transcripcional (Wu et al, 1998). De forma similar a otros factores transcripcionales, CtrA puede regular positiva o negativamente a sus genes blanco. Se ha descrito que en aquellos genes regulados directamente, la interacción de CtrA con cajas completas o medias no determina si la regulación será positiva o negativa, pero el sitio de unión de CtrA en el promotor sí puede determinar el tipo de regulación. Cuando el motivo de unión se

encuentra cercano a la posición -35 del promotor, CtrA funciona como un activador transcripcional; sin embargo, cuando el sitio de unión se encuentra cercano a la posición -10 del mismo, CtrA puede actuar como un represor (Zhou et al, 2015).

A pesar de que se asume que la forma fosforilada de CtrA (CtrA-P) es la versión de la proteína capaz de unirse al DNA y regular la transcripción de sus genes blanco, se sugiere que la versión no fosforilada pueda también detonar la expresión de algunos genes. Lo anterior se propone a partir del estudio de la expresión de la proteína de la cápside de la partícula tipo fago denominada agente de transferencia de genes de *R. capsulatus* (RcGTA) que depende del sistema CckA/ChpT/CtrA para su expresión. Se observó que en una mutante en CckA o en ChpT en las cuales CtrA no estaría fosforilada, la cápside del RcGTA puede ser expresada, pero no liberada de la célula. Es entonces necesaria la presencia del sistema CckA/ChpT/CtrA completo para poder expresar todos los factores necesarios para expresar y liberar al RcGTA (Mercer et al, 2012).

Hasta el momento, con la finalidad de caracterizar el conjunto de genes regulados por CtrA, en otras palabras el regulón CtrA, en las distintas α -Proteobacterias, la estrategia experimental seguida ha sido la de microarreglos (Pini et al, 2015; Laub et al, 2002; Mercer et al, 2010; Greene et al, 2012; Wang et al, 2014), así como Chip-seq para la identificación de genes directamente regulados por este factor (Laub et al, 2002; Francis et al, 2017; Mercer et al, 2010; Pini et al, 2015; Zhou et al, 2015).

En *C. crescentus*, la actividad de CtrA varía a lo largo del ciclo celular, regulando la activación y represión de genes, y bloqueando la iniciación de la replicación del DNA, mediante su asociación al origen de replicación, por lo que es una proteína esencial para su viabilidad (Laub et al, 2002). CtrA regula la replicación del cromosoma por su asociación a cinco sitios en el origen de replicación, generando sobrelape con un sitio de unión a DnaA y con el promotor fuerte de la replicación (Quon et al, 1998).

Con respecto a la regulación génica, CtrA en *C. crescentus* regula 250 genes, de los cuales al menos 95 son regulados directamente. Dentro de los que regula están aquellos implicados en la división celular, metilación del DNA, replicación y reparación del DNA, RNA polimerasa, proteínas ribosomales, flagelo, quimiotaxis, pili, reguladores transcripcionales y factores sigma, por señalar algunos (Laub et al, 2002).

En otras α -proteobacterias como *Rhodobacter capsulatus*, CtrA regula 227 genes. Se distingue de su ortólogo en *C. crescentus* por no ser esencial, ni participar en el ciclo celular, en cambio, regula genes involucrados en la formación de vesículas de gas, agente de transferencia de genes (RcGTA), biogénesis de pili y flagelo, así como en la expresión de genes quimiotácticos, reguladores transcripcionales y factores sigma (Mercer et al, 2010).

El análisis transcriptómico del regulón CtrA en *R. capsulatus* se realizó en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento mostrando que CtrA presenta regulones variables en ambas fases de crecimiento. Teniendo que ambas fases comparten la expresión diferencial de 149 genes; sin embargo, en la fase logarítmica, CtrA regula exclusivamente un conjunto de 31 genes, mientras que en la fase estacionaria un total de 47. En la fase estacionaria dicho factor incrementa la expresión de genes implicados en sistemas de transporte de Fe^{2+} , así como los genes del agente de transferencia de genes RcGTA implicados en la transferencia horizontal de genes (Mercer et al, 2010).

CtrA regula otros grupos de genes en otras α -proteobacterias estudiadas hasta el momento; por ejemplo, en *Dinoroseobacter shibae* CtrA regula positivamente la expresión de genes del sistema sensor de quórum (Wang et al, 2014). En *Magnetospirillum magneticum* la expresión de algunos genes involucrados en la síntesis del magnetosoma son regulados positivamente por CtrA; sin embargo, la síntesis de dichas estructuras no se ve afectada en la ausencia de este factor, por lo que aún no queda claro el rol de CtrA en la fisiología del magnetosoma (Greene et al, 2012). En *Sphingomonas melonis* CtrA regula de forma positiva los genes involucrados en la síntesis de diGMPc y

exopolisacáridos, lo que concuerda con el hecho de que la formación de biopelícula en este organismo es regulada por dicho factor transcripcional (Francez-Charlot et al, 2015).

Como se mencionó anteriormente, CtrA es un regulador de respuesta ampliamente representado en las α -Proteobacterias, encontrando posibles ortólogos de éste en prácticamente todo el clado, con algunas excepciones, como *Pelagibacter ubique* (Mercer et al, 2010).

Algunos árboles filogenéticos generados con la secuencia aminoacídica de CtrA de algunos representantes de los principales órdenes de las α -proteobacterias permiten visualizar dos grupos (Figura 3): el primero contiene a los Rhodobacterales, Esfingomonadales, Rhodospirillales y Rickettsiales, siendo este último el orden más basal. El segundo grupo comprendería a los Caulobacterales y a los Rhizobiales. Dentro del primer clado se conocen ejemplos como *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *Silicibacter sp. TM1040*, *Ruegeria sp. TM1040*, *Dinoroseobacter shibae*, *Rhodospirillum centenum*, *Magnetospirillum magneticum* y *Sphingomonas melonis* de los que se sabe que CtrA no controla el ciclo celular y que no es necesario para su viabilidad, en cambio, para el segundo grupo, de los cuales se ha estudiado a CtrA de *C. crescentus*, *Brucella abortus* y *Sinorhizobium meliloti* se sabe que CtrA funciona como un regulador del ciclo celular y que por lo tanto es esencial para la viabilidad. Es de destacar que la función regulada por CtrA más ampliamente distribuida entre las α -proteobacterias es la de la motilidad (genes flagelares y quimiotácticos), con excepción de las Rickettsiales (Mercer et al, 2010; Greene et al, 2012). Por lo anterior, algunos grupos sugieren que la función de CtrA en el ancestro de las α -proteobacterias era el controlar los genes flagelares y el ciclo celular, y que en el grupo al que pertenece *R. capsulatus* el control del ciclo celular se perdió (Mercer et al, 2010). Otros grupos sugieren que en realidad el papel ancestral de CtrA era el del control de la motilidad y que posteriormente en el grupo al que pertenece *C. crescentus* CtrA se convirtió en una proteína esencial (Greene et al, 2012).

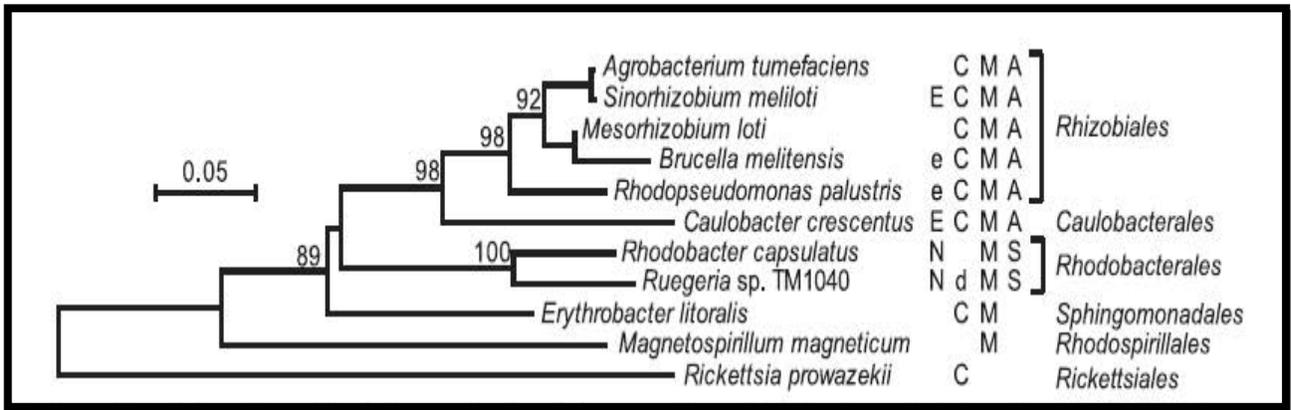


Figura 3. Relación entre la filogenia de las alfa-proteobacterias y la función de CtrA. Las funciones posibles de CtrA son indicadas (E: CtrA es esencial para la viabilidad celular, e: posiblemente esencial, N: no esencial, C: implicado en el ciclo celular, d: posible rol en la división celular, M: involucrado en motilidad). El modo de división de la bacteria se señala para algunos casos (A: asimétrica, S: simétrica). Son indicados los órdenes de alfa-proteobacterias considerados en este análisis. Las relaciones evolutivas fueron inferidas por el método de unión de vecinos (Neighbor joining). Tomado de Mercer et al, 2010.

Regulación de la actividad de CtrA en *Caulobacter crescentus*

La actividad de CtrA es regulada a tres niveles: transcripción, fosforilación y proteólisis, a lo largo del ciclo celular en *C. crescentus* (Figuras 4 y 5).

La degradación de CtrA depende de su estado de fosforilación y del reconocimiento de la firma AA en su extremo C por el complejo de degradación, el cual consta de las proteínas ClpXP, RcdA, CpdR, PopA y de la molécula c-di-GMP (Figura 4). El complejo ClpXP se conforma del oligómero formado por ClpX, que permite el reconocimiento, desenrollamiento y translocación de CtrA al oligómero formado por ClpP, el cual contiene sitios activos de hidrólisis en su cara interna. El regulador de respuesta CpdR puede ser fosforilado por el sistema CckA/ChpT. Se sabe que un su estado no fosforilado (entendiéndose que CtrA estaría en la misma forma) CpdR promueve la degradación de CtrA, al igual que PopA-c-di-GMP. PopA-c-di-GMP es capaz de interactuar con CtrA y con la proteína RcdA. Por lo anterior, se sugiere que un complejo RcdA/PopA-c-di-GMP/CtrA sea reclutado al complejo ClpXP

cuando CpdR no está fosforilado, llevando a la degradación de CtrA. La degradación de CtrA ocurre durante la fase G1 del ciclo celular y en el polo prostecado de la célula predivisional, lo que permite la iniciación de la replicación (Smith et al, 2014).

La transcripción de CtrA es controlada por la misma CtrA y por los reguladores del ciclo celular GcrA y SciP (Figura 5). Una vez transcurrida la fase G1 del ciclo celular en la cual CtrA ha sido degradada de la célula para permitir la iniciación de la replicación del cromosoma (en la célula prostecada temprana), CtrA comienza a ser transcrita de nueva cuenta por acción de GcrA (cuya expresión depende de DnaA, factor esencial para iniciar la replicación) que lo transcribe desde el promotor débil P1 en estado hemimetilado. Posteriormente, CtrA promueve su propia transcripción desde el promotor P2, alcanzando altas concentraciones, para que entonces, reprima su propia transcripción desde el promotor P1. A su vez, SciP es expresado por acción de CtrA, alcanzando su pico de expresión en la célula predivisional, en la cual actúa como un represor transcripcional de la propia CtrA (Zhou et al, 2015).

La regulación del estado de fosforilación de CtrA está dictado por su cinasa/fosfatasa CckA, la cual a su vez es modulada por las proteínas DivL, PleC, PleD, DivJ y DivK (Lori et al, 2015) (Figura 4).

En la célula nadadora o en el polo nadador de la célula predivisional, la proteína DivL asociada a la cinasa/fosfatasa CckA estimula su actividad cinasa. En el mismo polo la fosfatasa PleC defosforila a DivK y a PleD. La defosforilación de DivK permite que DivL pueda llevar a cabo su rol activador sobre CckA. PleD es una diguanilato ciclasa que en su estado fosforilado produce al segundo mensajero c-di-GMP (el c-di-GMP se une a CckA y promueve su actividad fosfatasa). La defosforilación de PleD en estas condiciones promueve la actividad cinasa de CckA (Lori et al, 2015).

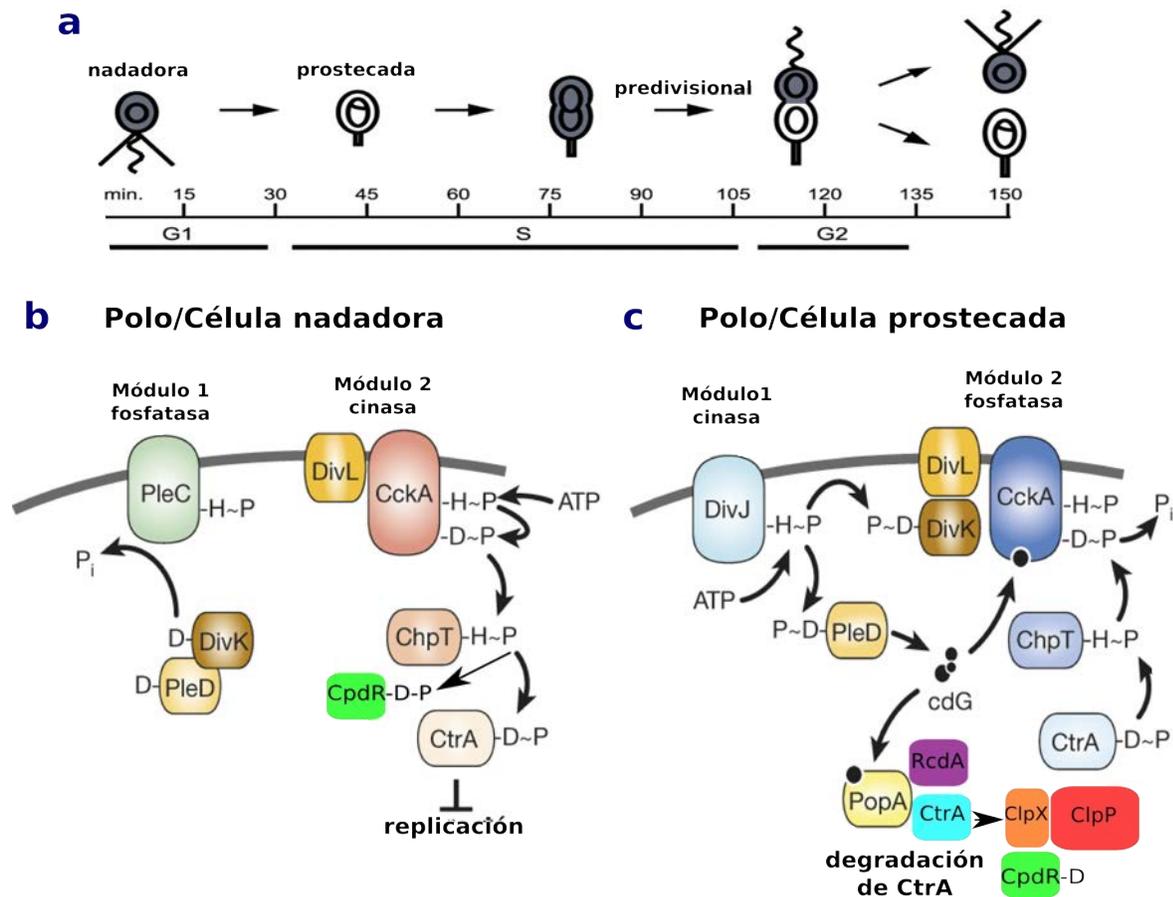


Figura 4. Circuito regulatorio que modula la progresión del ciclo celular en *C. crescentus*. (a) Ciclo celular en *C. crescentus*. Son señaladas las fases G1, S y G2, así como los tiempos en minutos a los que corresponden. (b y c) Circuito regulatorio que regula la fosforilación y degradación de CtrA para el control del ciclo celular. Modificado de Laub et al, 2002 y de Lori et al, 2015.

En la célula prostecada o en el polo prostecado de la célula predivisional, la cinasa DivJ fosforila a DivK y a PleD. DivK-P inhibe a DivL y con ello la actividad cinasa de CckA. Similarmente, PleD-P produce al segundo mensajero c-di-GMP el cual se une a CckA, fomentando su inactivación. Lo anterior lleva a la defosforilación de CtrA por la actividad fosfatasa de CckA (CckA se comporta como fosfatasa cuando no es activada) (Lori et al, 2015).

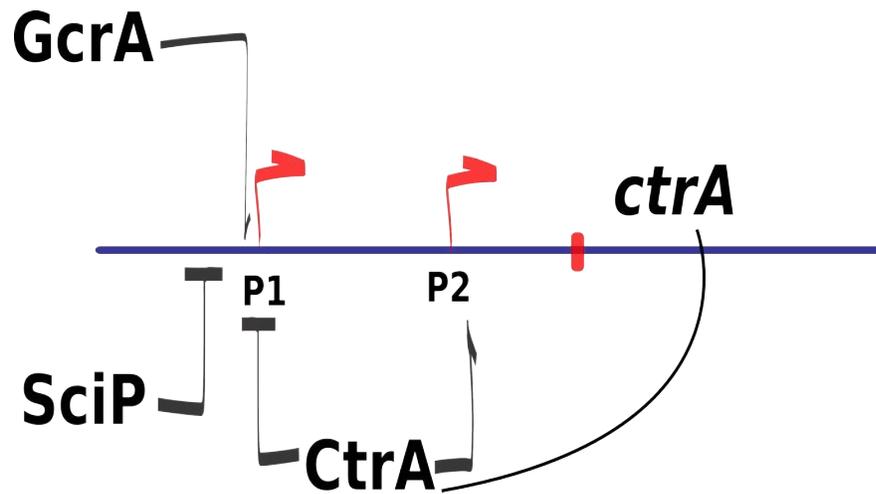


Figura 5. Regulación transcripcional de *ctrA* en *C. Crescentus*. El gen *ctrA* es regulado transcripcionalmente por la misma CtrA y por los factores GcrA y SciP de forma variable a lo largo del ciclo celular (ver texto).

Generalidades de *Rhodobacter sphaeroides*

R. sphaeroides es una bacteria púrpura no sulfurosa perteneciente al clado de las α -proteobacterias. Presenta un amplio repertorio metabólico ya que puede crecer mediante respiración aeróbica o anaeróbica, fotosíntesis y fermentación, además de poder fijar N_2 cuando escasean otras fuentes de este elemento. Puede llevar a cabo fotosíntesis fotoheterotróficamente, usando compuestos orgánicos como fuente de carbono y poder reductor o fotoautotróficamente, usando CO_2 como fuente de carbono, y H^+ como poder reductor. Puede además crecer quimioheterotróficamente o quimioautotróficamente (Mackenzie et al, 2001).

A la fecha, las cepas 2.4.1 y WS8N de *R. sphaeroides* han sido más ampliamente estudiadas. La cepa WS8N es un derivado de la cepa WS8, que difiere de ésta por ser resistente al ácido nalidíxico. A diferencia de la cepa 2.4.1, WS8N presenta una incrementada motilidad y quimiotaxis, por lo que los

estudios en estas áreas la han usado como modelo de estudio. El genoma de WS8N es de 4.42 Mpb, tiene un contenido de GC de 69.1% y consta de dos cromosomas circulares, CI y CII, de 3.14 y 0.97 Mpb, así como de dos plásmidos, pA y pB, de 200 y 100 Kpb respectivamente. Tras su secuenciación se predijeron 4,205 secuencias codificantes, 52 genes para tRNA y 9 genes para rRNA (Porter et al, 2011).

Esta bacteria presenta dos sistemas flagelares funcionales que le permiten desplazarse en medios acuosos, el sistema Fla1 (adquirido por un evento de transferencia horizontal de una gama-proteobacteria ancestral) que da lugar a la formación de un flagelo subpolar y el sistema Fla2 (adquirido por transferencia vertical) que forma un flagelo lofótrico (Poggio et al, 2007) (Figura 6).

Como ocurre en *R. capsulatus*, *CtrA* no es esencial para la viabilidad de esta bacteria, en cambio, se ha demostrado que regula la transcripción de genes flagelares *fla2* (Vega-Baray et al, 2015) así como del operón quimiotáctico *cheOp1* que controla a este flagelo (Hernández-Valle et al, 2017), mientras que el sistema flagelar Fla1 es regulado por el activador transcripcional FleQ (Poggio et al , 2005).

Cuando *R. sphaeroides* se crece bajo las condiciones de cultivo usualmente usadas en el laboratorio (usando ácidos C4-dicarboxílicos a concentraciones de 15-34 mM) expresa el sistema flagelar Fla1 pero no su sistema endógeno Fla2. Hasta el momento se han obtenido un conjunto de cepas mutantes capaces de expresar el flagelo Fla2 pero solo en un fondo genético Fla1- (mutantes en *fleQ*). Dichas cepas *fleQ*- Fla2+, como la cepa AM1 llevan una mutación en *cckA*, específicamente la cepa AM1 presenta la mutación L391F, la cual se encuentra a 5 aminoácidos del residuo fosforilable (H397). La mutación anterior promueve una mayor autofosforilación de la proteína lo que lleva finalmente a la activación de *CtrA*, a través de *ChpT* y a la expresión de los genes flagelares Fla2 (Vega-Baray et al, 2015).

En *R. sphaeroides* durante el crecimiento fotoheterotrófico en medio mínimo de Sistro con ácido

succínico como fuente de carbono a una concentración de 15mM, CckA es transcripcionalmente reprimida, mientras que a una concentración de 100 μ M de la misma fuente de carbono o con 0.2 % de casaminoácidos dicha represión no se observa. Se ha visto que otros ácidos C4 dicarboxílicos como ácido málico y ácido furámico desencadenan la misma respuesta, lo que nos habla del papel inhibitorio de los ácidos C4 dicarboxílicos sobre la transcripción de *cckA* (Vega-Baray et al, 2015).

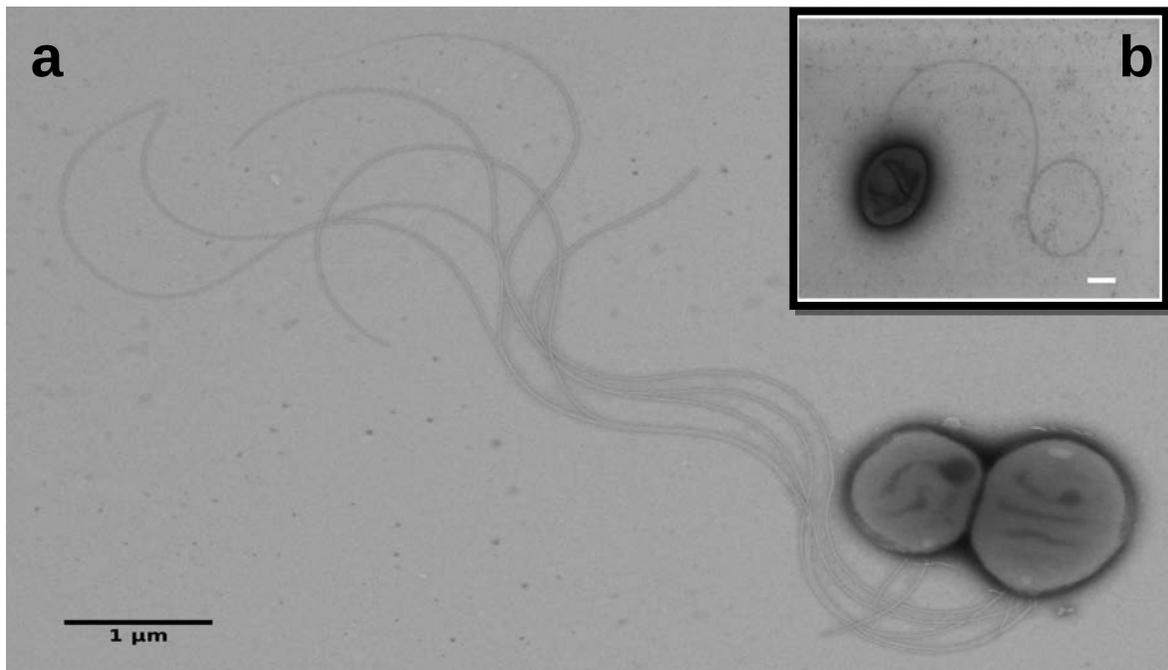


Figura 6. *R. sphaeroides* y sus dos sistemas flagelares. (a) Micrografía electrónica de la cepa AM1 expresando el flagelo lofótrico Fla2. (b) Micrografía electrónica de la cepa WS8N expresando el flagelo subpolar Fla1, tomada de De la Mora et al, 2015.

Como se mencionó, el operón quimiotáctico *cheOp1* es regulado transcripcionalmente por CtrA. El operón *cheOp1* contiene a los genes RSWS8N_02465, *cheY5*, *mcpB*, *tlpS*, *mcpA*, *cheD*, *cheX*, *cheY1*, *cheA1*, *cheW1*, *cheR1*, y *cheY2*. Se determinó que la expresión de CheY2, CheY5 y McpA a nivel de proteína es dependiente de CtrA, al igual que la transcripción del gen *mcpB*. Aunado a lo anterior se sugiere que dicho operón quimiotáctico puede ser regulado directamente por CtrA, siendo la secuencia TTAG-N7-TTAT, ubicada en la posible región regulatoria del operón, el posible motivo de unión de

dicho factor (Hernández-Valle et al, 2017). Previamente había sido mostrado el control quimiotáctico de las proteínas codificadas por el operón *cheOp1* sobre el Fla2, lo que hace coherente que el flagelo y su sistema de control sean expresados por el mismo factor transcripcional (del Campo et al, 2011).

Planteamiento del problema

A la fecha se ha descrito el regulón CtrA en diversas α -Proteobacterias, como *Caulobacter crescentus*, *Rhodobacter capsulatus*, *Magnetospirillum magneticum*, *Sinorhizobium meliloti* y *Dinoroseobacter shibae*, regulando la transcripción de genes involucrados en división celular, metilación del DNA, replicación y reparación del DNA, RNA polimerasa, proteínas ribosomales, vesículas de gas, agente de transferencia de genes (RcGTA), biogénesis de pili y flagelo, así como en la expresión de genes quimiotácticos, reguladores transcripcionales, factores sigma, percepción de quórum, metabolismo del diGMPc y biofilm.

Con excepción de los genes flagelares *fla2* y de los genes quimiotácticos contenidos en el *cheOp1* que controlan su respuesta, se desconoce el resto de genes que podrían estar controlados por CtrA en *R. sphaeroides* y si algunos de ellos pudieran dar alguna idea de la forma en la cual este sistema de dos componentes es activado en condiciones naturales. A partir de ello se propuso identificar el regulón CtrA en este organismo.

Hipótesis

Considerando la cercanía filogenética entre *R. capsulatus* y *R. sphaeroides*, se espera que ambas compartan parte de sus regulones CtrA, por lo anterior es probable que genes como los de vesículas de gas, agente de transferencia de genes y pili estén regulados por CtrA.

Además de los genes quimiotácticos contenidos en el operón *cheOp1*, CtrA regulará otros genes quimiotácticos involucrados en la modulación de la rotación del flagelo Fla2.

Entre todos los genes controlados por CtrA, existirá un subconjunto de éstos que participen en el control del sistema CckA/ChpT/CtrA a nivel transcripcional y/o postranscripcional.

Objetivo general

Caracterizar el regulón CtrA en *Rhodobacter sphaeroides*.

Objetivos particulares

- Determinar mediante la técnica RNA-seq a través de la plataforma Illumina los perfiles transcripcionales de las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) de *R. sphaeroides*, para identificar los genes regulados por el factor transcripcional CtrA.
- Validar los niveles de expresión de algunos genes identificados por la metodología anterior mediante el uso de un gen reportero.
- Demostrar el control de CtrA sobre algunos procesos celulares que serán identificados a partir de los puntos anteriores.

Materiales y métodos

Oligonucleótidos

RsGTA_FW	g ggatcc agatcttctcgcccacg
RsGTA_RV	g ggatcc cgcctccgagatcagcttg
GvpN_FW	g ggatcc cagctacatggagcccgag
GvpN_RV	g tctaga cagatcctgcgcgcagcg
pucAp_FW	gc gaattc gaggccccaagccatcc
pucAp_RV	gc gagctc gaggaagtgcgcgatgag
GvpA_Flash_FW	g aagctt aggtcgcgcgtctcaccgg
GvpA_Flash_RV	g gagctc g ggctgtggcgggatccact

Cepas y plásmidos

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia o fuente
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
JV5	Derivado de AM1; <i>terminasa::uida-aada</i>	Este trabajo
JV6	Derivado de JV5; Δ <i>ctrA::hyg</i>	Este trabajo
JV7	Derivado de AM1; <i>gvpN::uida-aada</i>	Este trabajo
JV8	Derivado de JV7; Δ <i>ctrA::hyg</i>	Este trabajo
AM1	WS8N derivative; Δ <i>fleQ::kan cckAL391F</i>	del Campo et al, 2007.
LC7	Derivado de AM1; Δ <i>ctrA::hyg</i>	del Campo et al, 2007.
AE1	Derivado de AM1; Δ <i>ctrA::aadA</i>	Vega-Baray et al, 2015.
-	Derivado de AM1; Δ <i>flbT::hyg</i>	Colección del laboratorio
JV9	Derivado de JV7; Δ <i>flbT::hyg</i>	Este trabajo
JV10	Derivado de AM1; <i>gvpA-Tcys</i>	Este trabajo
JV11	Derivado de LC7; <i>gvpA-Tcys</i>	Este trabajo
WS8N	Cepa silvestre	Porter et al, 2011.
WS8N Δ <i>ctrA</i>	Derivado de WS8N; <i>ctrA::aadA</i>	Colección del laboratorio

WS8N $\Delta flgE1-flaA$	Derivado de WS8N; <i>flgE::aadA</i> <i>flaA::kan</i>	Colección del laboratorio
WS8N $\Delta ctrA-flgC1$	Derivado de WS8N; <i>ctrA::aadA</i> <i>flgC::kan</i>	Colección del laboratorio
AM1 $\Delta cerl::aadA$	Derivado de AM1; <i>cerl::aadA</i>	Colección del laboratorio

<i>Escherichia coli</i>		
TOP 10	Cepa para clonación	Invitrogen
HB101	Cepa para clonación	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969.

Plásmidos		
pJQ200mp18	Vector suicida utilizado en Gram-negativas; Gm ^r	Quandt & Hynes, 1993.
pRK415	Vector de expresión usado en <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	Keen et al, 1988.
pTCYC4	Vector integrativo para generar fusiones en el C terminal de proteínas con el motivo Tcys; Gm ^r	Thanbichler et al, 2007.
pCR-Blunt II-TOPO	Vector de clonación; Kan ^r	Invitrogen
pJQ200_terminase::uidA-aadA	pJQ200mp18 llevando <i>terminasa::uidA-aadA</i>	Este trabajo
pJQ200_gvpN::uidA-aadA	pJQ200mp18 portando <i>gvpN::uidA-aadA</i>	Este trabajo
pJQ200_flbT::hyg	pJQ200mp18 llevando <i>flbT::hyg</i>	Colección del laboratorio
pRK_pucBp_uidA-aadA	Derivado de pRK415 que expresa al gen reportero <i>uidA</i> y al gen <i>aadA</i> , bajo el control transcripcional de la región regulatoria de <i>pucB</i>	Este trabajo
pRk_ctrA	Derivado de pRK415 que expresa a <i>ctrA</i>	Vega-Baray et al, 2015.
pWM5	Vector fuente del casete <i>uidA-aadA</i>	Metcalf and Wanner, 1993.
pTZ18R_uidA-aadA	Derivado de pTZ18R que	Colección del laboratorio

	porta el casete <i>uidA-aadA</i>	
pTCYC-4_gvpA	Derivado de pTCYC-4 que presenta la fusión <i>gvpA-Tcys</i>	Este trabajo

Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

Se preparó con 1% de bacto triptona, 1% de cloruro de sodio y 0.5% de extracto de levadura, disueltos en agua bidestilada y esterilizados en autoclave. Para la preparación de medio sólido se adicionó 1.5% de bactoagar. Las cajas de LB sacarosa se adicionaron con 5% de sacarosa.

Medio mínimo de sistrom (SIS)

Este medio se preparó con 15 mM de ácido succínico, 0.67 mM de ácido glutámico, 0.25 mM de ácido aspártico, 8.5 mM de cloruro de sodio, 20 mM de fosfato dibásico de potasio, 3.78 mM de sulfato de amonio, 1.04 mM de ácido nitriloacético, 1.2 mM de sulfato de magnesio, 0.23 mM de cloruro de calcio, 7 μ M de sulfato ferroso, 0.16 mM de molibdato de amonio y 0.1 ml/l de elementos traza, siendo el pH ajustado a 7 con hidróxido de potasio. Una vez esterilizado y estando a temperatura ambiente, se le adicionó 0.1 ml/l de solución de vitaminas. Para la condición fotoheterotrófica anaeróbica SIS (88 μ M ác. succínico), se preparó medio SIS sin ácido succínico. La adición de 100 μ l de inóculo (proveniente de un cultivo crecido en SIS adicionado con 15 mM de ácido succínico) a 17 ml de medio SIS sin ácido succínico, generaba una concentración de 88 μ M de ácido succínico.

Solución de elementos traza

Consta de 4.7 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 38 mM de sulfato de zinc, 18 mM de sulfato ferroso, 9 mM de sulfato de manganeso, 1.5 mM de sulfato cúprico y 1.8 mM de ácido bórico, disueltos en agua bidestilada.

Solución de vitaminas

Solución de 1% de ácido nicotínico, 0.5% de tiamina y 0.01% de biotina en agua bidestilada y esterilizada por filtración.

Condiciones de crecimiento

Escherichia coli

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio Luria-Bertani (LB). Los cultivos líquidos contenidos en tubos de ensayo se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm, a 37°C. Los cultivos crecidos en placas de agar se incubaron a la misma temperatura.

R. sphaeroides

R. sphaeroides se cultivó en medio mínimo de Sistrom (SIS) cuando se creció en medio líquido y en medio LB para placas. Para la condición quimioheterótrofica aeróbica los cultivos líquidos contenidos en tubos de ensayo se incubaron a 30°C en agitación constante a 200 rpm en oscuridad. Los cultivos crecidos en placas de agar se incubaron a 30°C en oscuridad. Para la condición fotoheterotrófica anaeróbica se utilizó ácido succínico a 100 μM ó a 15 mM ó casaminoácidos a 0.2% como fuente de carbono. Los cultivos líquidos se crecieron en viales llenados a tope con medio SIS, sellados con Parafilm (Bemis), el volumen de los viales varió de 2 a 6 ml y se incubaron a 30°C en presencia de luz artificial constante, a 20 cm de 3 focos incandescentes de 80W durante tiempos variables (16 h-10 días).

Antibióticos

De ser requerido, los siguientes antibióticos se adicionaron a los medios de cultivo a las siguientes concentraciones:

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Espectinomicina (Spc)	100 µg/ml	50 µg/ml
Kanamicina (Kan)	50 µg/ml	25 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	15 µg/ml	1 µg/ml
Gentamicina (Gm)	30 µg/ml	5 µg/ml
Higromicina (Hyg)	150 µg/ml	150 µg/ml (medio sólido) y 20 µg/ml (medio líquido).
Ampicilina (Ap)	100 µg/ml	-

Obtención de cepas

Para obtener las cepas JV5 (AM1 *terminasa::uidA-aadA*) y JV6 (AM1 Δ *ctrA terminasa::uidA-aadA*) los oligonucleótidos RsGTA_FW y RsGTA_RV se usaron para amplificar por PCR un producto de 1,197 pb, que contiene un segmento de la región codificante del marco de lectura RSWS8N_02570 (*terminasa*), así como 214 pb correspondientes a la región río arriba. El producto se clonó en el plásmido pTZ18R. El plásmido resultante se digirió con EagI (posición 857 pb del gen *terminasa*) para linealizarlo, los extremos cohesivos se eliminaron usando a la T4 DNA polimerasa. Entonces se ligó a un fragmento de 4-kb obtenido del plásmido pWM5, el cual se digirió con BamHI y reparó con T4 DNA polimerasa, que contiene el casete *uidA-aadA* (Metcalf and Wanner, 1993). El fragmento que contiene al alelo *terminasa::uidA-aadA* se subclonó en el plásmido pJQ200mp18. Subsecuentemente el plásmido anterior se introdujo en la cepa TOP10, la cual se conjugó con las cepas AM1 y LC7 para reemplazar al gen silvestre cromosómico mediante doble recombinación homóloga.

Una estrategia similar se siguió para generar las cepas JV7 (AM1 *gvpN::uidA-aadA*) y JV8 (AM1 Δ *ctrA::hyg gvpN::uidA-aadA*). Una región de 1,292 pb se amplificó mediante PCR, usando los

oligonucleótidos GvpN_FW y GvpN_RV, el producto resultante se clonó en el plásmido pTZ18R. El plásmido obtenido se digirió con EcoNI (posición 365 del gen *gvpN*), los extremos cohesivos se repararon usando T4 DNA polimerasa y entonces el plásmido linearizado se ligó al fragmento *uidA-aadA* previamente mencionado. El fragmento *gvpN::uidA-aadA* se subclonó en el plásmido pJQ200mp18. El producto anterior se conjugó en las cepas AM1 y LC7.

Para obtener las cepas JV10 (AM1 *gvpA*-Tcys) y JV11 (AM1 Δ *ctrA::hyg gvpA*-Tcys) los oligonucleótidos GvpA_Flash_FW y GvpA_Flash_RV se usaron para amplificar por PCR un producto de 684 pb, que contiene a la región codificante del marco de lectura RSWS8N_19394 (*gvpA1*), así como 475 pb correspondientes a la región río arriba. El producto se clonó en el plásmido pCR2.1. El plásmido resultante se digirió con HindIII y SacI para liberar el fragmento correspondiente a *gvpA*, éste se subclonó en el plásmido pTCYC-4 digerido previamente de la misma manera. Subsecuentemente, el plásmido anterior se introdujo en la cepa TOP10, la cual se conjugó con las cepas AM1 y LC7 para que se diera la integración del plásmido en el cromosoma. La fusión resultante GvpA-Tcys presenta un péptido de 34 aminoácidos añadido al C terminal de GvpA. Dicho péptido presenta el motivo de tetracisteínas CCPGCC al cual se une covalentemente la molécula FLAsH-EDT2 (Invitrogen) para generar un complejo fluorescente.

Obtención del plásmido pRK415 *pucBp uidA-aadA*

Los oligonucleótidos *pucAp_FW* and *pucAp_RV* se usaron para amplificar por PCR una región de 536 pb que comprende a la región regulatoria del operón *pucBAC* y 126 pb de *pucB*, el primer gen del operón. El producto de PCR se clonó en el vector pCR2.1. El plásmido resultante se digirió con EcoRI/SacI para liberar el fragmento de interés que entonces se ligó al plásmido pTZ18R *uidA-aadA* previamente digerido de la misma manera. La aproximación anterior nos permitió posicionar al gen reportero *uidA* bajo el control de la región regulatoria *pucBp*. El fragmento *pucBAC uidA-aadA* se liberó con la digestión EcoRI/XbaI siendo posteriormente subclonado en el plásmido pRK415, para después ser introducido en las cepas AM1 y LC7 por conjugación.

Obtención de los perfiles transcripcionales de las cepas AM1 y AE1 mediante RNA-seq

Aislamiento de RNA

Las cepas AM1 y su derivado AE1 (AM1 Δ ctrA::aadA) de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrom adicionado con 100 μ M de ácido succínico bajo iluminación continua por 16 h. El RNA total se aisló usando el estuche de reactivos RiboPure (Thermo Fisher), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Lo anterior se llevó a cabo por triplicado para cada cepa.

Depleción de RNA ribosomal

La calidad del RNA se evaluó previo a la depleción del RNA ribosomal mediante electroforesis en capilar usando un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies). Posteriormente, 5 μ g de RNA total se usaron para llevar a cabo la depleción del RNA ribosomal usando los reactivos de "Ribo-Zero rRNA removal kit for Gram-Negative Bacteria" (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones en los tiempos de incubación: el RNA total resuspendido en la solución "Ribo-Zero rRNA removal solution" se incubó a 68°C por 10 minutos seguido por una incubación a temperatura ambiente por 15 min. El RNA tratado se mezcló con las perlas magnéticas a temperatura ambiente por 10 min, entonces dicha reacción se incubó en baño maría a 50°C por 10 min.

Preparación y secuenciación de librerías

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo el protocolo "High Sample (HS)" de la guía "TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Guide" (illumina). La secuenciación pareada de las librerías se realizó mediante la plataforma IlluminaNextSeq 500. La longitud de las secuencias generadas fue de 76 pb. Ambos procesos se realizaron por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA de la UNAM.

Procesamiento de los datos de secuenciación

La calidad de los reads se confirmó usando FastQC (version 0.10.0; <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), teniendo una calidad de las secuencias por base de al menos Q30 para todas las muestras secuenciadas. Los reads se alinearon al genoma de *R. sphaeroides* WS8N (Porter et al, 2011), usando el software SMALT (version 0.7.6; <https://www.sanger.ac.uk/science/tools/smalt-0>) con los parámetros predeterminados (k=13, s=13). Las secuencias genómicas usadas en este trabajo corresponden a *R. sphaeroides* WS8N (NCBI secuencias de referencia NZ_CM001161.1, NZ_CM001162.1, NZ_CM001163.1 y NZ_CM001164.1), que atañen a las secuencias del cromosoma I, cromosoma II, plásmido A y plásmido B. Se generó una tabla de conteos usando la herramienta "coverageBed" de Bamtools (version 2.4.0; Barnett et al, 2011). Dichos procesos se realizaron por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA de la UNAM.

Análisis de expresión diferencial de genes

Se calcularon "conteos por millón" para la tabla de conteos previamente generada con la función "cpm" de edgeR (version 3.12.1; Robinson et al, 2010). Aquellos genes con al menos un conteo por millón en por lo menos tres de las seis muestras de la tabla de conteos, se mantuvieron para el análisis de expresión diferencial. El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con la paquetería DESeq2 (version 1.10.1; Love et al, 2014) en el ambiente R, usando como datos de entrada la tabla de conteos previamente procesada. Los genes con un $\log_2\text{foldchange} \geq 2$ o ≤ -2 y un $\text{padj} \leq 0.01$ se consideraron como diferencialmente expresados y por lo tanto como parte del regulón CtrA en *R. sphaeroides*.

Identificación de sitios de unión potenciales (PBS) de CtrA y definición de operones

Una matriz de peso posicional (PWM) que describe el sitio de unión completo a CtrA (TTAA-N7-TTAAC) en *C. crescentus* (Brilli et al, 2010) se usó para evaluar la presencia de sitios de unión

potenciales (PBS) para los genes regulados por CtrA en *R. sphaeroides*. Para la identificación de sitios de unión medios a CtrA (TTAAC) fue construida una PWM usando los 131 sitios medios de unión reportados en *C. crescentus* (Zhou et al, 2015). El genoma de *R. sphaeroides* WS8N fue entonces analizado usando las PWMs mencionadas a través del programa Matrix Scan Quick and Simple de la suite RSAT (Regulatory Sequences Analysis Tool) (Turatsinze et al, 2008). El programa se corrió con orden de Markov =1 para la estimación del “modelo background” y un pval $\leq 1e-04$. Las secuencias propuestas por dicho análisis se visualizaron en Artemis (versión 16.0.0; Carver et al, 2012) simultáneamente con el genoma de WS8N. Todas aquellas secuencias localizadas en la región intercistronica a 300 pb río arriba de los genes regulados por CtrA de acuerdo a nuestro RNA-seq fueron considerados como posibles PBS. Aquellos genes transcritos en la misma dirección y con menos de 15 pb de distancia entre ellos fueron considerados como operones potenciales.

Mapa de Calor

Se calcularon FPKMs (fragmentos alineados al gen / tamaño del gen en kilobases/ millones de reads mapeados) a partir de los reads crudos (sin previo proceso de normalización), para los genes diferencialmente expresados, usando la función `fpm()` de DESeq2 (version 1.10.1; Love et al, 2014). Entonces a dichos valores se les aplicó \log_2 para la construcción del mapa de calor, el cual fue generado usando la función “heatmap.2” de la paquetería gplots (version 3.0.1; <https://CRAN.R-project.org/package=gplots>) en el ambiente R. El gráfico resultante se editó en el programa Inkscape (version 2; <https://inkscape.org/es/>) para mostrar los resultados derivados de la identificación de PBSs y algunos grupos de genes relevantes para este trabajo.

El agrupamiento de genes se realizó de la siguiente forma:

1. Los genes se separaron en dos categorías: aquellos regulados positivamente por CtrA y aquellos regulados negativamente.

2. Los genes dentro de la categoría "regulados positivamente (+)" se agruparon en dos nuevas clases: aquellos que tuvieran menos de 50 FPKMs en la cepa mutante en *ctrA* y aquellos que tuvieran más de 50 FPKMs, asumiendo que por debajo de 50 FPKMs no habría transcripción o ésta sería muy baja. Este valor fue tomando como referencia a partir de los datos de expresión de los genes flagelares *fla2* que dependen de CtrA para expresarse (Vega-Baray et al, 2015).

Lo mismo se hizo para los genes de la categoría "regulados negativamente (-)" pero ahora aplicando el criterio anterior con los FPKMs de la cepa AM1.

3. Una vez teniendo las 4 categorías los genes se ordenaron por su posición en el genoma.

Análisis de enriquecimiento funcional

Se utilizaron categorías COG (Tatusov et al, 2000) para agrupar a los genes del regulón CtrA en *R. sphaeroides* en grupos funcionales. Para esto, se usó el programa eggNOG-mapper (Huerta-Cepas et al, 2017) corriendo las paqueterías HMMER (Eddy, 1995) y DIAMOND (Buchfink et al, 2015), dado que la categoría COG de algunos genes se definió con una paquetería pero no con la otra. Para aquellos genes que no se agruparon en alguna categoría o que cayeron en los grupos S (función desconocida) o R (función general) se llevó a cabo una búsqueda con BLAST (Altschul et al, 1990) contra una base de datos de nuestra colección, la cual está asociada a categorías COG. La búsqueda con BLAST fue hecha usando un e-value de $1e-5$, los mejores hits que tuvieron una cobertura de $\geq 70\%$ y una identidad $\geq 30\%$ se consideraron como posibles homólogos de nuestras secuencias problema y por lo tanto usados para asignar una categoría COG. Posteriormente algunos genes que no pudieron ser resueltos se agruparon manualmente, tomando en cuenta evidencia experimental de su función y la presencia de dominios conservados asociados a determinados procesos celulares. La mayoría de los genes de vesículas de gas se agruparon en una nueva categoría denominada "GasV", dado que muchos de ellos permanecían asociados a la categoría S (función desconocida).

Evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrom adicionado con 100 µM de ácido succínico bajo iluminación continua por 48 h en viales llenos hasta el tope; las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en amortiguador ICM (10 mM KPO₄, 1 mM EDTA, pH 7.2 (O’Gara & Kaplan, 1997) y se sonicaron por 30 seg, seguido por centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 15 min. Los sobrenadantes se recuperaron y su espectro de absorción de 700 a 900 nm se determinó con un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent). Los valores de absorción se normalizaron usando el contenido de proteína de cada extracto, el cual se determinó por el método de Bradford usando el estuche de reactivos marca Bio-Rad. Para lo anterior, los valores de absorbancia se dividieron entre el valor de absorbancia de la muestra a 595 nm después de la reacción de Bradford. Todos los análisis se llevaron a cabo al menos por triplicado.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrom adicionado con 100 µM de ácido succínico bajo iluminación continua por 16 h en viales totalmente llenos. Las células se colectaron por centrifugación, se lavaron y finalmente se resuspendieron en PBS. Una rejilla recubierta con carbono (Formvar/carbon B, 200 mesh copper grid) previamente ionizada se colocó sobre una gota de células lavadas durante 5 min, la rejilla entonces se tiñó negativamente con una solución de ácido fosfotúngstico 2% (pH 7.0) por 3 min, se enjuagó con agua destilada y se secó, para finalmente ser vista en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200EXII (Jeol).

Ensayo de flotabilidad

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrom adicionado con 0.2% de casaminoácidos como fuente de carbono y 0.15% de Bacto agar en viales llenos al 80% de su capacidad. Las células inoculadas se resuspendieron por inversión y entonces los viales se incubaron recibiendo iluminación continua de forma lateral a una de las paredes durante 7-10

días.

Ensayo de la actividad de la β -glucoronidasa

Los ensayos de β -glucoronidasa se realizaron como se indica previamente (Hernández-Valle et al, 2017). La actividad enzimática específica se expresó como picomoles de metilumbeliferona por minuto por miligramo de proteína. El contenido de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford.

Inducción de formación de biopelícula

Las cepas de *R. sphaeroides* se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrom adicionado con 0.2% de casaminoácidos como fuente de carbono en viales llenados al 80% de su capacidad (condición aeróbica) o al 100 % (condición anaeróbica). Las células inoculadas se resuspendieron por inversión y entonces los viales se incubaron bajo iluminación continua a 30°C hasta 10 días.

Ensayo de retención de cristal violeta

Se recuperó 1 ml de las células del fondo de los viales del ensayo de "Inducción de formación de biopelícula" en tubos de 1.5 ml, entonces se vortexearon durante 3 segundos con la finalidad de eliminar aquellas falsas interacciones entre células-células y células-matriz. Enseguida, se centrifugaron por 10 seg en una minicentrífuga. Posteriormente, los precipitados se lavaron por inversión con amortiguador de fosfatos 0.01 M y se centrifugaron de la misma manera. Dichos lavados se hicieron por duplicado. Los paquetes celulares finalmente se tiñeron con una solución de cristal violeta (CV) al 0.5% durante 15 min, entonces se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos para quitar el excedente de CV. Las células lavadas se resuspendieron en 100 μ l de DMSO al 100% y se centrifugaron a 13,000 rpm. El sobrenadante se resuspendió en 900 μ l de amortiguador de fosfatos y su absorbancia se determinó a 595 nm.

Observación de la biopelícula al microscopio confocal

Las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) se crecieron como se indica en el apartado "Inducción de formación de biopelícula" y posteriormente se tiñeron con cristal violeta como se señala en el apartado correspondiente. 5 μ l de células teñidas se depositaron en un portaobjetos cubierto con agarosa al 1.5% y se visualizaron en el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM. Se tomaron fotografías a un aumento de 60X en campo claro. Además, la autofluorescencia de las células en rojo debida a los pigmentos de *R. sphaeroides* (Kaiser et al, 1981) se aprovechó para visualizar a las células embebidas en la matriz de la biopelícula.

Microscopía de fluorescencia de GvpA-Tcys

Las cepas JV10 y JV11 se crecieron fotoheterotróficamente en medio mínimo de Sistrof adicionado con 100 μ M de ácido Succínico como fuente de carbono durante 16 h. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 0.01 M. A 20 μ l de las células anteriores se les adicionó el mismo volúmen de una solución FLASH-EDT2 (Invitrogen) para ser entonces incubadas por 30 min a 30°C en completa oscuridad. Posteriormente se lavaron con 40 μ l de buffer de lavado BAL 1X. (Invitrogen) Finalmente las células se depositaron en la superficie de un portaobjetos cubierto con agarosa al 1.5% . Se tomaron imágenes de epifluorescencia con un microscopio NIKON ELIPSE E600 a través de un filtro YFP a 1 seg de exposición.

Colocalización de GvpA-Tcys y FlgE2

Las cepas JV10 y JV11 se crecieron y colectaron como se mencionó en el apartado anterior. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído (3% concentración final) por 20 min a temperatura ambiente, centrifugaron y lavaron con PBS 1X para remover el excedente de paraformaldehído. Entonces se realizó la tinción de GvpA-Tcys como se indica en el apartado anterior. Las células volvieron a ser fijadas. Posteriormente se resuspendieron en PBS (pH 7.4) con 1% de albumina de suero bovino (BSA). El anticuerpo primario FlgE2 previamente teñido con Zenon Alexa Fluor 546

(Invitrogen) se añadió a una dilución 1:50. Las células se incubaron por 2 h y finalmente se lavaron con PBS. Las imágenes de epifluorescencia se tomaron como se señaló, utilizando los filtros YFP y mCherry a 1 seg de exposición.

Western Blot

Para este ensayo las células se crecieron como se describe en el ensayo de flotabilidad durante 10 días y se tomaron de diferentes regiones de los viales: superficie, medio y fondo. Entonces se lavaron con medio SIS sin fuente de carbono para quitar el excedente de agar. Las células lavadas se lisaron por sonicación y se hirvieron durante 5 min en solución PBS (Tabla "Soluciones utilizadas en Western Blot"). Las muestras se resolvieron mediante una electroforesis discontinua por un gel concentrador (4% de acrilamida) y por un gel de resolución (10% de acrilamida). Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa electroforéticamente. Para ello el gel de acrilamida se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa para después ser sumergidos en una solución amortiguadora de transferencia (Tabla "Soluciones utilizadas en Western Blot") y expuestos a una corriente de 250 mA durante 1 hora. Entonces la membrana se incubó en una solución TBS-T adicionada con leche al 2% durante 1 hora. La membrana se lavó con 15 ml de la solución TBS-T. Posteriormente se incubó en presencia del anticuerpo anti-FlgE2 a una concentración de 1:40,000 por 3 h disuelto en la solución TBS-T. La membrana se lavó con la solución TBS-T tres veces (10min c/u) para después ser incubada con el anticuerpo secundario tipo IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (1:10,000) por 45 min. Después de 4 lavados de 10 min con la solución TBS-T se incubó con el sustrato quimioluminiscente CDP-star (Applied Biosystems), siendo finalmente expuesta a una placa fotosensible, la cual se reveló y fijó. Se cargaron 2 µg de proteína para cada muestra, con excepción de la muestra WS8N superficie, para la cual se cargaron 0.2 µg.

Soluciones utilizadas en Western blot	
Solución de Corrida del gel de acrilamida-SDS	Solución compuesta por 250 mM de glicina, 25mM de Tris base y SDS 0.1%. pH 8.3
Solución de Transferencia	Compuesta por 3 mM de carbonato de sodio, 10 mM de bicarbonato de sodio y metanol al 20%. pH 9.9
Solución TBS	Solución que contiene 50 mM de Tris-HCl y 150 mM de cloruro de sodio, disueltos en agua bidestilada estéril. pH 7.5
Solución TBS-Tween 0.1% (TBS-T)	Idéntica a la solución TBS pero adicionada con 0.1% del detergente Tween-20.
Solución PBS	Solución acuosa que contiene 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na ₂ PO ₄ y 0.18 mM de KH ₂ PO ₄ . pH 7.2

Resultados

Regulación CtrA en *R. sphaeroides*

El análisis de expresión diferencial de genes a partir de los perfiles transcripcionales de las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) de *R. sphaeroides* crecidas en una condición fotoheterotrófica con 100 μ M de ácido succínico como fuente de carbono durante 16 h, en la cual CtrA se encuentra en su forma fosforilada o activa, arrojó un total de 321 genes diferencialmente expresados entre ambas cepas (regulación CtrA) (Anexo 7). Dichos genes por lo tanto presentan un cambio en la expresión de al menos 4 veces entre las cepas AM1 y AE1 (considerando que la tasa de cambio se expresa como su log2) y un valor de probabilidad ajustado de 0.01 o menor (Figura 7). De los 321 genes, 239 son regulados de forma positiva por CtrA, mientras que 82 son regulados negativamente.

La Figura 7 permite visualizar que CtrA tiene principalmente un rol de activador transcripcional sobre sus genes blanco y que en su ausencia la expresión de un gran número de genes se ve afectada.

De los 321 genes regulados por CtrA, saltan a la vista algunos grupos de genes: flagelares Fla2, quimiotácticos, vesículas de gas, pili, agente de transferencia de genes RsGTA, respuesta a estrés, metabolismo de diGMPc, transporte y metabolismo de sustratos, reguladores transcripcionales, factores sigma, sistema regulatorio CtrA, fotosíntesis y fijación de carbono (Figura 8).

El conjunto de genes flagelares 2, o *fla2*, que corresponden a 41 genes, son regulados positivamente por CtrA (log2FC promedio = -7.7; padj promedio = 6.3e-14). Lo cual sustenta lo previamente reportado sobre la regulación de dichos genes por este factor transcripcional (Vega-Baray et al, 2015) (Anexo 7).

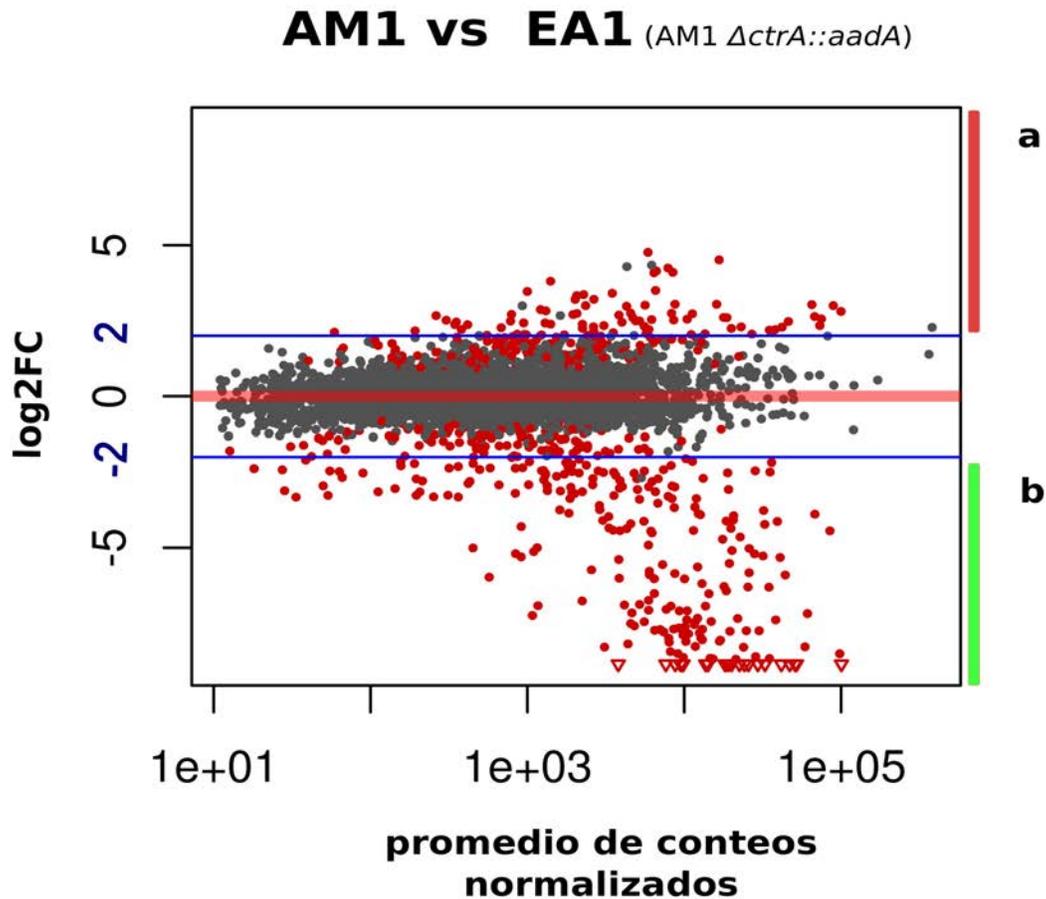


Figura 7. Plot MA en el que se muestra la tasa de cambio en la expresión de genes entre las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) así como su grado de expresión. En el eje X se grafica el promedio de conteos normalizados para cada gen, mientras que en Y se muestra el cambio en la expresión de cada gen entre las cepas AM1 y AE1 expresado en log2 Fold Change. Las líneas azules representan el valor de corte de Log2 Fold Change ($= |2|$) usado para definir aquellos genes que se encuentran diferencialmente expresados. Los puntos rojos corresponden a aquellos genes con un $padj \leq 0.01$, según la paquetería de expresión diferencial DESeq2. Por lo anterior aquellos puntos rojos por encima de $\log_2FC = 2$ (a) corresponden a los genes regulados negativamente por CtrA, mientras que aquellos por debajo de $\log_2FC = -2$ (b) son regulados de forma positiva.

Anteriormente, se mostró que el operón quimiotáctico *cheOp1* cuyos productos controlan la respuesta quimiotáctica del Fla2 es regulado por CtrA (Hernández-Valle et al, 2017). Nuestro transcriptoma corrobora que los genes del *cheOp1*: *RSWS8N_02465*, *cheY5*, *mcpB*, *tlpS*, *mcpA*, *cheD*, *cheX*, *cheY1*, *cheA1*, *cheW1*, *cheR1* y *cheY2* son regulados positivamente por CtrA (\log_2FC promedio = - 6.6; $padj$

promedio = 1.32×10^{-7}) y además que CtrA regula a los genes que codifican para los receptores quimiotácticos *mcpJ* ($\log_2FC = -2.1$; $p_{adj} = 0.0014$), *mcpR* ($\log_2FC = -9.6$; $p_{adj} = 4.22 \times 10^{-6}$), *mcpV* ($\log_2FC = -8.3$; $p_{adj} = 2.47 \times 10^{-68}$) y *tlpL* ($\log_2FC = -7.4$; $p_{adj} = 5.8 \times 10^{-46}$), así como a los genes del *cheOp2*: *cheY3*, *cheA2*, *cheW2*, *cheW3*, *cheR2*, *cheB1* y *tlpC* (\log_2FC promedio = -4.6 ; p_{adj} promedio = 8.59×10^{-7}).

Además, CtrA regula positivamente a los genes RSWS8N_14745, *cpaA*, RSWS8N_14755, *tadC*, *tadB*, *cpaF* y *cpaE* (\log_2FC promedio = -2.9 ; p_{adj} promedio = 3.25×10^{-9}), contenidos en un cluster de 8 genes, los cuales están implicados en la biogénesis de un pili tipo Tad/Cpa, del cual aún no se tiene evidencia experimental de su presencia en *R. sphaeroides*.

Los genes RSWS8N_02560, *terminasa*, *portal* y RSWS8N_02580 del operón que codifica para el bacteriófago denominado RsGTA (**gene transfer agent**) son regulados positivamente por CtrA (\log_2FC promedio = -2.8 ; p_{adj} promedio = 5.30×10^{-7}). Cabe señalar que dicho operón contiene al menos 15 genes y que los mencionados anteriormente corresponden a los primeros cuatro de dicha unidad transcripcional. La baja o nula expresión de los genes del resto del operón puede explicar el porque no aparecen en este análisis.

Como se mencionó previamente, el aparato fotosintético puede dividirse en tres complejos: el complejo antena, el centro de reacción y el complejo citocromo bc1 (Vermeglio & Joliot, 1999). Según los resultados transcriptómicos, CtrA reprime a nivel transcripcional la expresión del complejo antena y del centro de reacción de *R. sphaeroides*, ya que dicha proteína regula negativamente la expresión de genes cuyos productos están implicados en la biosíntesis de bacterioclorofila a: *bchC*, *bchF*, *bchI*, *bchM*, *bchX*, *bchY* y *bchZ* (\log_2FC promedio = 2.4 ; p_{adj} promedio = 6.05×10^{-4}); síntesis de carotenos: *crtA*, *crtE* y *crtI* (\log_2FC promedio = 2.7 ; p_{adj} promedio = 2.54×10^{-4}); proteínas del complejo antena: *pufA*, *pufB*, *pucA1*, *pucB1*, *pucC*, *pucA2* y *pucB2* (\log_2FC promedio = 2.8 ; p_{adj} promedio = 6.59×10^{-5}); centro de reacción: *puhA*, *pufQ*, *pufL*, *pufM* y *pufX* (\log_2FC promedio = 2.4 ; p_{adj} promedio = 8.26×10^{-7}).

6); y el antirrepresor *appA* ($\log_2FC = 2.1$; $p_{adj} = 0.003$).

De manera similar, CtrA regula negativamente la expresión de los genes *cbbA*, *cbbL* y *cbbS* (\log_2FC promedio = 4.5; p_{adj} promedio = $2.10e-9$) contenidos en el operón *cbbI* y de *cbbP*, *cbbT*, *cbbG*, *cbbA* y *cbbM* (\log_2FC promedio = 2.3; p_{adj} promedio = $1.95e-5$) pertenecientes al operón *cbbII*, involucrados en la fijación de carbono por la reducción de CO_2 mediante las enzimas del ciclo de Calvin. Es importante resaltar que las dos rubiscos de *R. sphaeroides* (rubisco I: *cbbL* y *cbbS*; rubisco II: *cbbM*) se encuentran dentro de dichos operones.

CtrA también activa la expresión de los genes involucrados en la formación de vesículas de gas que comprenden al locus *gvpA1* y al posible operón formado por *gvpN*, RSWS8N_19454, *gvpO*, *gvpA2*, *gvpH*, *gvpL/F*, *gvpG*, *gvpL/F*, *gvpL/F*, *gvpS*, *gvpL/F* y *gvpK* (\log_2FC promedio = -8.8; p_{adj} promedio = $3.66e-42$).

Los genes *sciP* ($\log_2FC = -3.2$; $p_{adj} = 7.18e-9$), *cckA* ($\log_2FC = -7.7$; $p_{adj} = 1.14e-115$), *pleD* ($\log_2FC = -7.3$; $p_{adj} = 5.28e-59$), *pleC* ($\log_2FC = -7.5$; $p_{adj} = 8.01e-82$) y *divL* ($\log_2FC = -7.7$; $p_{adj} = 2.43e-64$), cuyos ortólogos están involucrados en la regulación del sistema CtrA en *C. crescentus*, son regulados positivamente por CtrA.

Dentro del regulón encontramos además tres cinasas de histidina putativas: RSWS8N_05640 ($\log_2FC = -2.5$; $p_{adj} = 1.81e-7$), RSWS8N_07875 ($\log_2FC = -5.3$; $p_{adj} = 2.79e-23$) y RSWS8N_12015 ($\log_2FC = -3.3$; $p_{adj} = 9.69e-13$), así como tres reguladores de respuesta: RSWS8N_09490 ($\log_2FC = -8.5$; $p_{adj} = 2.9e-65$), RSWS8N_11510 ($\log_2FC = -5.1$; $p_{adj} = 8.33e-41$) y *osp* ($\log_2FC = -4.1$; $p_{adj} = 3.88e-14$), todos los anteriores siendo regulados positivamente por CtrA.

Dentro del metabolismo del c-di-GMP, cuatro genes son regulados por CtrA: RSWS8N_05330 ($\log_2FC = -2.2$; $p_{adj} = 0.008$) y RSWS8N_10780 ($\log_2FC = -7.44$; $p_{adj} = 1.34e-55$) se predice que

presentan actividad de diguanilato ciclasas así como de fosfodiesterasas, mientras que RSWS8N_07355 ($\log_2FC = -8.7$; $p_{adj} = 4.58e-82$) y *pleD* ($\log_2FC = -7.3$; $p_{adj} = 5.28e-59$) sólo tendrían actividad de diguanilato ciclasas.

CtrA regula un conjunto de genes implicados en el transporte y metabolismo de sustratos. Para el metabolismo de carbohidratos regula negativamente la expresión de 4 genes implicados en su transporte: *smoE*, *xytF*, RSWS8N_11705 y RSWS8N_15484 (\log_2FC promedio = 2.3; p_{adj} promedio = $2.69e-3$), y de algunos genes implicados en su metabolismo: *mxoF* ($\log_2FC = 2.3$; $p_{adj} = 9.46e-6$), *eda* ($\log_2FC = -2.5$; $p_{adj} = 2.97e-6$), *galM* ($\log_2FC = -3$; $p_{adj} = 2.22e-12$) y RSWS8N_03930 ($\log_2FC = 3$; $p_{adj} = 2.40e-11$). Además, regula positivamente la expresión de tres genes implicados en el transporte de poliaminas: RSWS8N_14665, RSWS8N_14670, RSWS8N_14675 (\log_2FC promedio = -4; p_{adj} promedio = $1.92e-28$); así como de RSWS8N_01655, RSWS8N_01660 y RSWS8N_01665 (\log_2FC promedio = -2.3; p_{adj} promedio = $1.32e-5$), involucrados en el transporte de aminoácidos, regulando además genes implicados en su catabolismo como *hutH* ($\log_2FC = -4.7$; $p_{adj} = 3.44e-19$). CtrA también reprime la transcripción del transportador de Fe, *fhub* ($\log_2FC = 2$; $p_{adj} = 0.004$).

Algunos genes involucrados en la respuesta a estrés son regulados de manera positiva, como lo son *recA* ($\log_2FC = -3.9$; $p_{adj} = 1.79e-12$), *recQ* ($\log_2FC = -3.3$; $p_{adj} = 6.44e-13$), y *radC* ($\log_2FC = -7.9$; $p_{adj} = 3.59e-62$) implicados en la reparación del DNA; *groES*, *groEL* (\log_2FC promedio = -3.7; p_{adj} promedio = $2.91e-9$), el factor sigma *rpoH* ($\log_2FC = -3.8$; $p_{adj} = 3.29e-18$) implicados en la reparación de proteínas citoplásmicas mal plegadas y en la respuesta a estrés calórico y estrés fotooxidativo; la glutatión sintetasa *gshB* ($\log_2FC = -4.4$; $p_{adj} = 4.78e-23$), necesaria para mantener el equilibrio redox celular; el factor antisigma *rsbW* y el anti-sigma *rsbV* (\log_2FC promedio = -7.2; p_{adj} promedio = $2.58e-23$) que se propone controlan la acción en respuesta a estrés de un factor sigma hasta ahora desconocido. En cambio, el factor antisigma de respuesta estrés *rsiW* ($\log_2FC = 4.1$; $p_{adj} = 1.24e-12$), el gen *uvrB* ($\log_2FC = 2.4$; $p_{adj} = 1.01e-9$) implicado en la reparación del DNA y el gen

bsaA ($\log_2FC = 2.7$; $p_{adj} = 0.0003$) que codifica a la glutatión peroxidasa son regulados negativamente.



Figura 8. Principales funciones celulares, estructuras o proteínas reguladas por CtrA en *R. sphaeroides* de acuerdo a los resultados de RNA-seq. En verde se señalan aquellos grupos de genes regulados positivamente, en rojo los regulados negativamente y en café aquellos que presentan ambos tipos de regulación.

Identificación bioinformática de motivos de unión a CtrA

Con la finalidad de identificar motivos de unión a CtrA (cajas completas y medias), en las regiones regulatorias de los genes identificados como regulados por esta proteína, se analizaron los cromosomas I y II, así como los plásmidos A y B de la cepa WS8N de *R. sphaeroides* valiéndonos de diferentes PWMs (Position Weight Matrix).

Para la identificación de cajas completas se utilizó la PWM reportada por Brill et al, 2010, con una secuencia consenso TTAA-N7-TTAAC. Dicha PWM se generó a partir de un conjunto de 54 regiones regulatorias controladas directamente por CtrA (Laub et al, 2002) en la α -Proteobacteria *C. crescentus*. Para la búsqueda de motivos de unión medios o "cajas medias", se generó una PWM usando 131 sitios de unión a CtrA reportados como cajas medias para genes regulados positiva y negativamente en la α -Proteobacteria *C. crescentus* (Zhou et al, 2015), siendo la secuencia consenso de dicho motivo TTAAC.

El genoma completo de la cepa WS8N se analizó con el programa RSAT matrix-scan QUICK and Simple de la suite RSAT (Regulatory Sequences Analysis Tool); de estos resultados, se seleccionaron los posibles sitios de unión a CtrA ubicados en las regiones intercistrónicas a no más de 300 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción de los loci (genes individuales u operones) identificados como regulados por CtrA (Materiales y Métodos).

Se obtuvieron un total de 54 regiones intercistrónicas con sólo cajas completas, 10 regiones con sólo cajas medias y 18 regiones con cajas completas y medias (Anexo 8).

Dado que muchos de los genes regulados por CtrA forman parte de operones, es importante definirlos para así valorar de manera más certera el número de genes directamente regulados por CtrA. Por ello se consideró que aquellos genes localizados a no más de 15 pb de distancia entre ellos y que tuvieran el mismo sentido de la transcripción, serían considerados como operones potenciales. Por lo anterior, de los 321 genes reportados como regulados por CtrA, 115 estarían regulados de forma directa, ya sea por cajas completas o medias cajas.

Considerando dichos posibles sitios de unión a CtrA, la secuencia consenso para la caja completa sería TTAA-N7-TTAA, mientras que para la caja media sería TTAA (Figura 9).

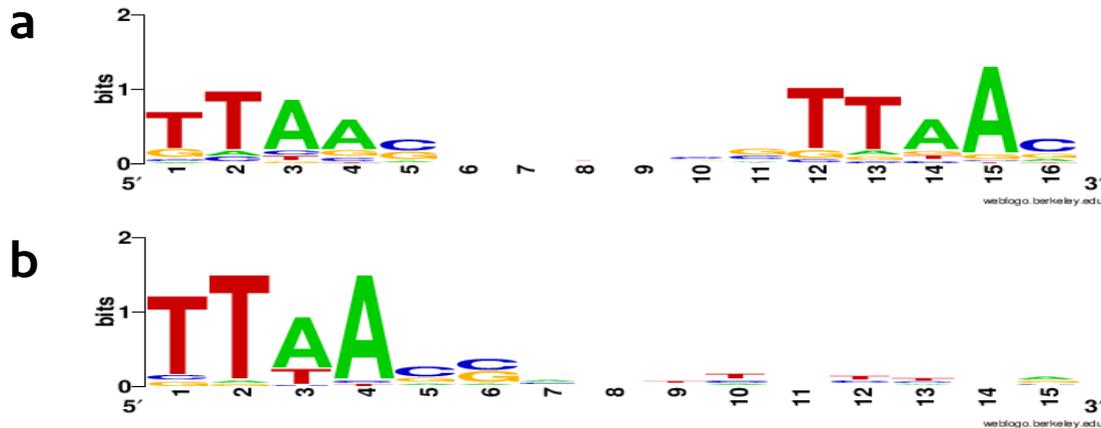


Figura 9. Logos de las secuencias consenso correspondientes a la caja completa TTAAN7-TTAA (a) y la media caja TTAA (b) propuestas en este trabajo como motivos de unión a CtrA. Dicha propuesta fue generada a partir de las cajas completas y medias cajas predichas para los genes del regulón CtrA en *R. sphaeroides*.

Mapa de calor del regulón CtrA

Se generó un mapa de calor de los genes regulados por CtrA con la finalidad de observar los cambios de expresión de los genes entre las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$), así como para visualizar la expresión entre genes. Para ellos se usó la función heatmap.2 de la paquetería "gplots" de R, empleando como datos de entrada los FPKMs promedio de las cepas AM1 y AE1. Dado que la normalización dada por FPKM considera el tamaño de los genes, la comparación entre ellos en cuanto a su grado de expresión es válida. Se aplicó el log₂ a dichos datos con la finalidad de hacerlos más cercanos entre ellos y que la función heatmap.2 no tuviera problemas en graficar los cambios de expresión entre condiciones y entre genes (Figura 10).

A pesar de que existen métodos de agrupamiento que se basan en los patrones de expresión, se decidió agrupar a los genes del regulón por su posición en el genoma y en cuatro categorías, de acuerdo a si su regulación es positiva o negativa y de la medida en que CtrA afecta su expresión.

La categoría (a) corresponde al grupo de genes que presentan nula o muy baja expresión en ausencia de CtrA, pero que se encienden en su presencia (cepa AM1); el grupo (b) corresponde a los genes que presentan una expresión basal en ausencia de CtrA, pero incrementan su expresión en su presencia; la categoría (c) corresponde al grupo de genes que presentan nula o muy baja expresión en presencia de CtrA, pero que se encienden en su ausencia (cepa AE1) y el grupo (d) corresponde a los genes que ya presentaban una expresión basal en presencia de CtrA, pero incrementarían su expresión en su ausencia (Figura 10)

Algunos grupos de genes son identificados en el mapa de calor así como la presencia de los posibles sitios de unión a CtrA identificados con nuestro análisis bioinformático. En la columna BD (binding site) se señala en azul aquellos genes individuales o en operón para los cuales se predice únicamente cajas completas, en amarillo aquellos para los cuales sólo se predicen medias cajas y en verde aquellos que presentan ambas.

De esta forma podemos apreciar cómo los genes flagelares, quimiotácticos y de vesículas de gas se agrupan en su mayoría en la categoría "fuertemente regulados por CtrA de forma positiva" (a), el operón quimiotáctico *cheOp2* se agrupa en la categoría "parcialmente regulados de forma positiva" (b), algunos genes de la fijación de carbono se agrupan en la categoría "fuertemente regulados de forma negativa", mientras que el resto de genes de fijación de carbono así como los fotosintéticos se agrupan en la categoría "parcialmente regulados de forma negativa".

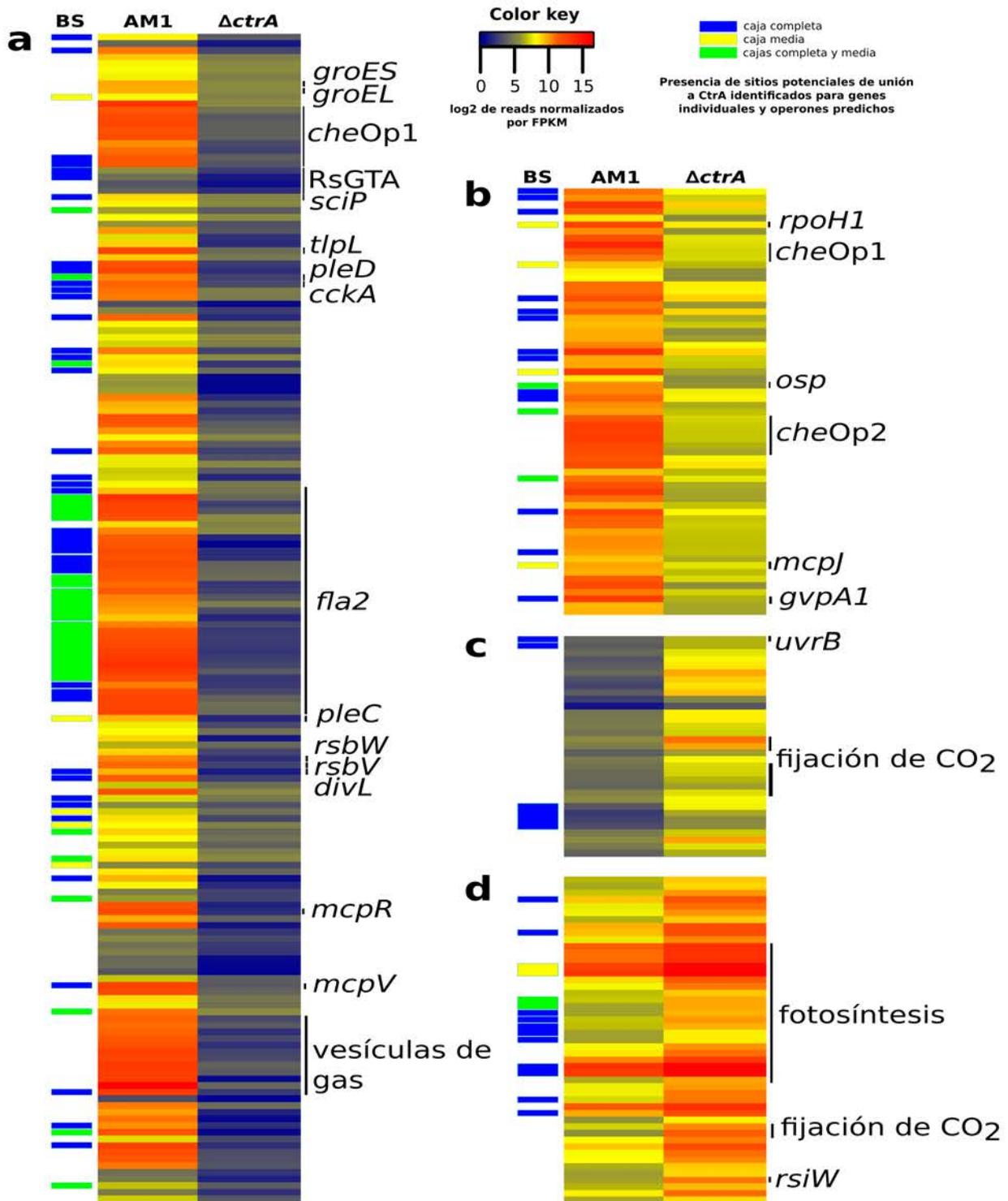
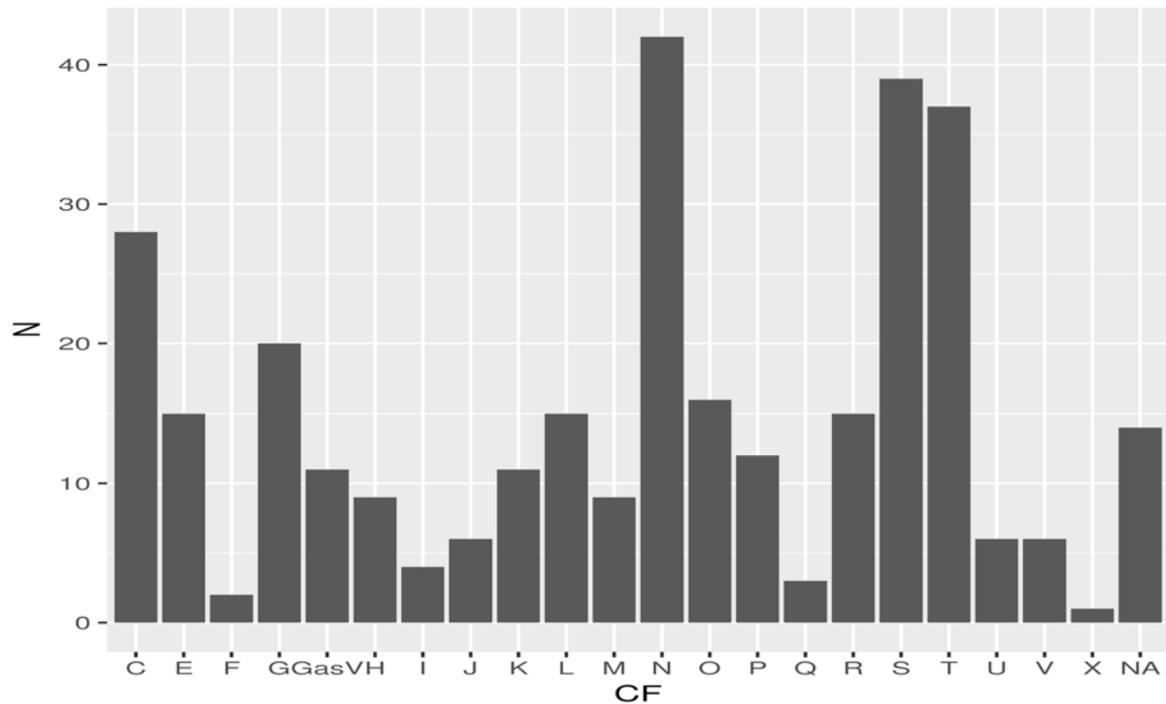


Figura 10. Mapa de calor del regulón CtrA. Perfiles de expresión de los genes regulados por CtrA según los resultados arrojados por Deseq2. Fue graficado el log2 de los FPKMs promedio de cada gen. Se tienen las categorías: fuertemente regulados por CtrA de forma positiva (a), parcialmente regulados por CtrA de forma positiva (b), fuertemente regulados por CtrA de forma negativa (c) y parcialmente regulados por CtrA de forma negativa (d). Son señalados en la columna "BD (binding sites)" los sitios de unión predichos para CtrA, ya sea para genes individuales o para operones en sus posibles regiones regulatorias. Con azul es señalada la presencia de únicamente cajas completas, con amarillo únicamente de medias cajas y con verde tanto de cajas completas como de medias cajas. Son indicados algunos grupos de genes.

Clasificación funcional del regulón CtrA

Una vez identificados los genes que son controlados por CtrA, se generó una clasificación funcional, usando categorías COG, utilizando el programa eggNOG-mapper. La búsqueda de homólogos con eggNOG-mapper se llevó a cabo con los programas HMMER y DIAMOND. Para resolver aquellos genes que no pudieron ser agrupados en alguna categoría funcional por la metodología anterior se usó complementariamente BLAST. Algunos genes fueron curados manualmente usando los siguientes criterios: conocimiento experimental de su participación en alguna de las funciones celulares, presencia de dominios conservados asociados a una función celular o existencia de ortólogos asociados a dicha función.

La metodología anterior permitió reducir el número de genes de función desconocida (S), de función general (R) o no asignados (#NA). Además, se añadió la categoría "GasV" para incluir a los genes de vesículas de gas, que sin la curación manual habrían quedado en la categoría de función desconocida (Materiales y Métodos) (Figura 11).



#Código Categoría funcional

- C Energy production and conversion
- D Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
- E Amino acid transport and metabolism
- F Nucleotide transport and metabolism
- G Carbohydrate transport and metabolism
- Gasv Gas Vesicles
- H Coenzyme transport and metabolism
- I Lipid transport and metabolism
- J Translation, ribosomal structure and biogenesis
- K Transcription
- L Replication, recombination and repair
- M Cell wall/membrane/envelope biogenesis
- N Cell motility
- O Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- P Inorganic ion transport and metabolism
- Q Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- R General function prediction only
- S Function unknown
- T Signal transduction mechanisms
- U Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- V Defense mechanisms
- X Mobilome: prophages, transposons
- NA Not assigned

Figura 11 . Agrupamiento funcional usando categorías COG del regulón CtrA. Es señalado el número de genes pertenecientes a cada categoría. N= número de genes, CF= categoría funcional.

Validación de la regulación transcripcional en genes seleccionados

Con la intención de validar los resultados obtenidos por el RNA-seq, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de la β -glucuronidasa codificada por el gen reportero *uidA*, al ser expresado bajo el control de las regiones regulatorias del operón RsGTA (gene transfer agent) o del operón de las vesículas de gas, siendo CtrA en ambos casos un regulador positivo según los resultados del RNA-seq. Para ello los genes de la *terminasa* del RsGTA y *gvpN* del operón de vesículas se interrumpieron con el gen *uidA* en el cromosoma de las cepas AM1 y LC7 (AM1 $\Delta ctrA::hyg$).

Además, se evaluó la actividad transcripcional del operón de fotosíntesis *pucBAC*, el cual es regulado negativamente por CtrA de acuerdo al RNAseq. Para ello se generó el plásmido pRK415 *pucBp uidA-aadA*, en el cual una región de aproximadamente 500 pb que contiene al promotor del operón fotosintético *pucBAC* se clonó de tal forma que el gen reportero *uidA* quedara bajo el control transcripcional de dicha región. El plásmido resultante se introdujo en las cepas AM1 y LC7.

Se obtuvieron extractos celulares totales de las cepas anteriores y posteriormente se cuantificó la actividad de la β -glucuronidasa (Figura 12).

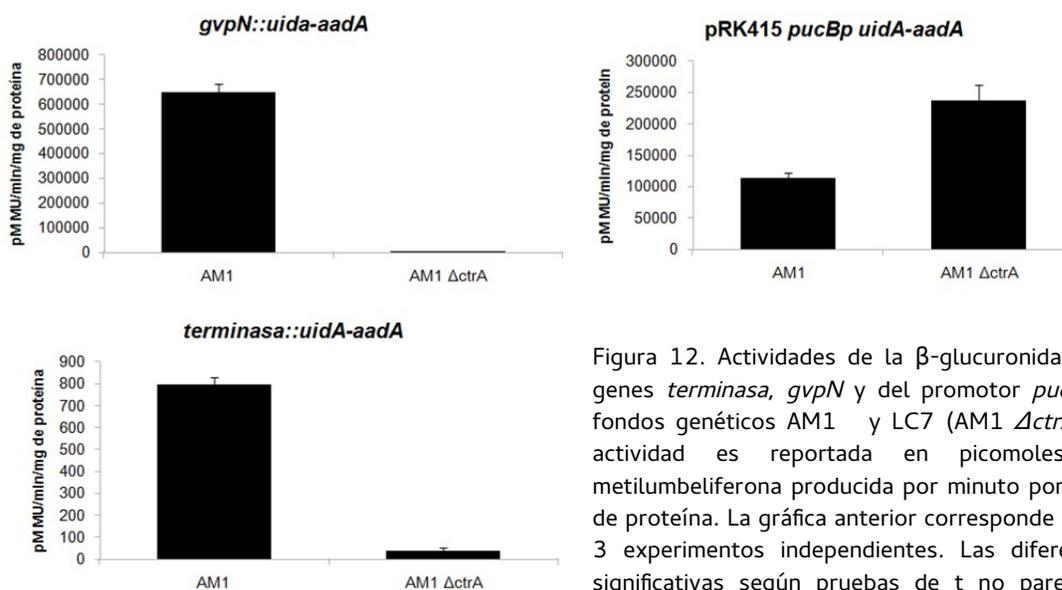


Figura 12. Actividades de la β -glucuronidasa de los genes *terminasa*, *gvpN* y del promotor *pucBp* en los fondos genéticos AM1 y LC7 (AM1 $\Delta ctrA::hyg$). La actividad es reportada en picomoles de 4-metilumbeliferona producida por minuto por miligramo de proteína. La gráfica anterior corresponde a al menos 3 experimentos independientes. Las diferencias son significativas según pruebas de t no pareadas, $p < 0.005$.

En congruencia con lo reportado por el RNA-seq, se observó una disminución en la actividad transcripcional de los genes *terminasa* y *gvpN* en el fondo genético de LC7 con respecto a la cepa AM1. Así mismo, detectamos un incremento de la actividad transcripcional del promotor *pucBp* en ausencia de CtrA (regulación negativa).

CtrA regula la flotabilidad mediada por vesículas de gas

Determinación de la presencia de vesículas de gas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Con la finalidad de evaluar la presencia de las vesículas de gas en la cepa AM1 y su posible afectación en las cepas AE1 (AM1 Δ *ctrA::aadA*), JV7 (AM1 *gvpN::uidA-aadA*) y JV8 (AM1 Δ *ctrA gvpN::uidA-aadA*), dichas cepas se crecieron fotoheterotróficamente en 100 μ M de ácido succínico y se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Figura 13). Como apoyo a este apartado, en la sección de anexos se presenta un panorama general de las vesículas de gas para su consulta (Anexo 2).

En la cepa AM1 se observó el flagelo lofótrico Fla2 así como estructuras ovoides en el polo flagelado de la célula que podrían corresponder a las vesículas de gas (VG). La ausencia de estas estructuras en la cepa mutante en *gvpN* (JV7) sugiere que dichas estructuras corresponden a las vesículas de gas. La cepa AE1 (*ctrA*) carece tanto del Fla2 como de vesículas de gas lo que robustece la idea anterior, ya que ambos grupos de genes son blancos transcripcionales de CtrA.

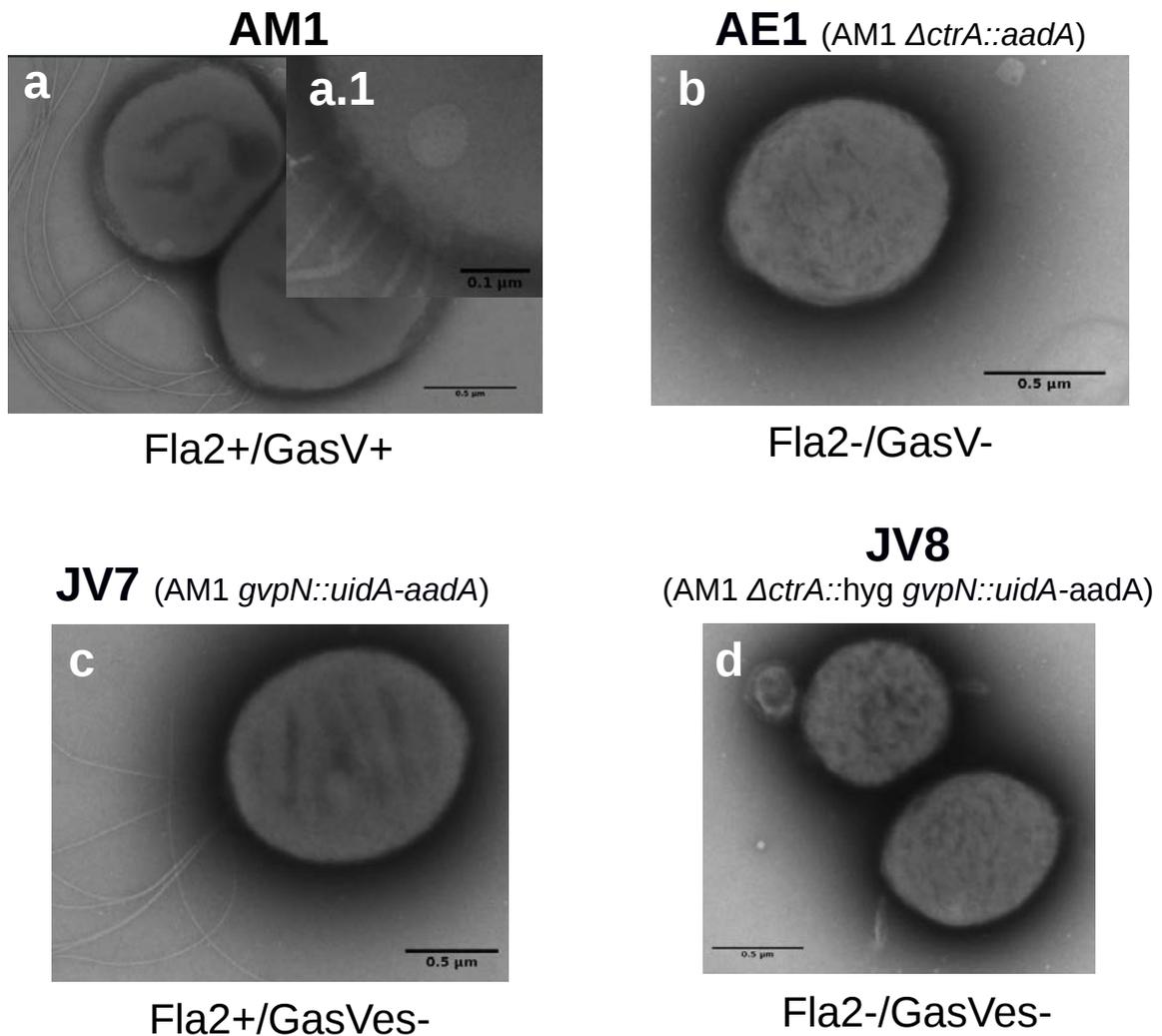


Figura 13. Micrografías electrónicas representativas de la cepa AM1, AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$), JV7 (AM1 *gvpN::uidA-aadA*) y JV8 (AM1 $\Delta ctrA::hyg gvpN::uidA-aadA$). Son indicadas las cepas y sus respectivos fenotipos.

Generación de la proteína fusión GvpA-Tcys

Como se mencionó con anterioridad, GvpA es la proteína estructural principal de las vesículas de gas (VG) tanto en bacterias como en arqueas. Por lo tanto, para confirmar la presencia de las VG en *R. sphaeroides* y que su expresión depende de CtrA, generamos la proteína fusión GvpA1-Tcys. El motivo de tetracisteínas (Tcys) añadido en el extremo C terminal de GvpA es capaz de asociarse

covalentemente a la molécula FLAsH-EDT₂, generando un complejo fluorescente. La fusión *gvpA1-Tcys* se expresó en las cepas AM1 y LC7 (AM1 $\Delta ctrA::hyg$), en un fondo genético en el cual la copia silvestre de *gvpA1* estaba presente, posteriormente dichas cepas se trataron con el reactivo FLAsH y se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Figura 14).

De acuerdo a lo esperado, se detectaron puntos de fluorescencia en la cepa JV10 (AM1 *gvpA-Tcys*), que probablemente corresponden a las vesículas de gas, que han incorporado a la proteína fusión GvpA-Tcys-FLAsH, en cambio, dicha señal fluorescente no se observó en la mutante JV11 (AM1 $\Delta ctrA::hyg$ *gvpA-Tcys*). Lo anterior apoya la idea de que efectivamente las VG se expresan en la cepa AM1 de *R. sphaeroides* y que su expresión depende del factor transcripcional CtrA.

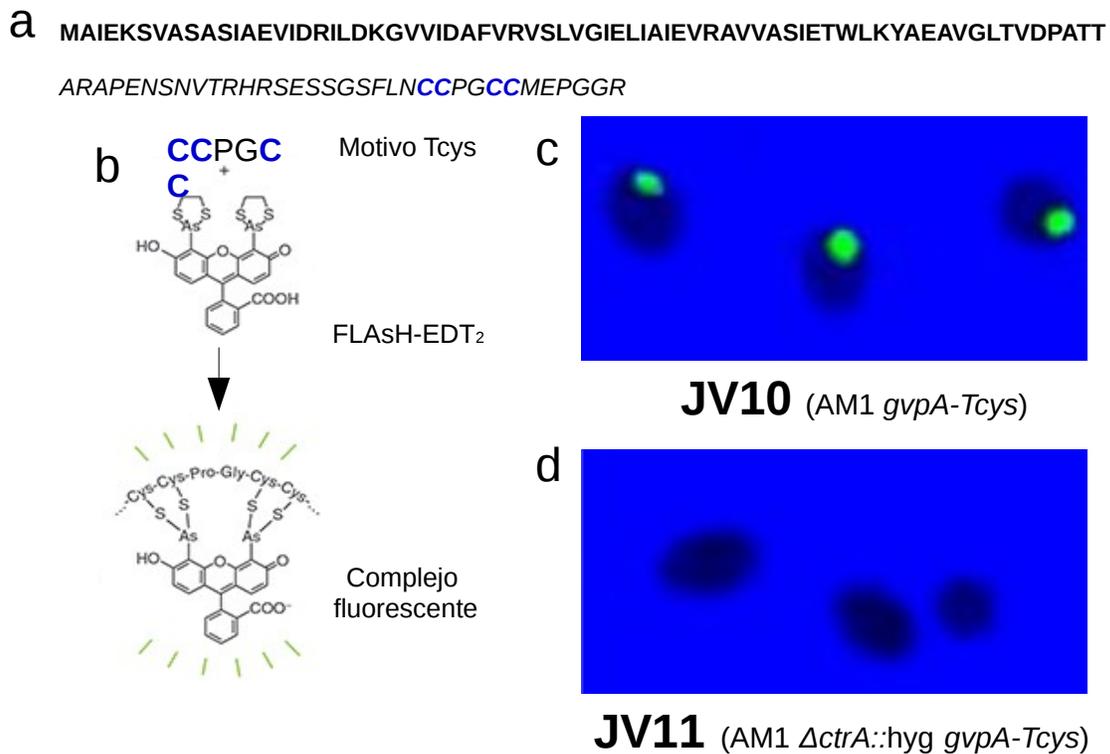


Figura 14. Detección de la proteína fusión GvpA1-Tcys. (a) Estructura primaria de la proteína fusión GvpA1-Tcys. En negritas se señala la secuencia correspondiente a GvpA1, en cursivas el péptido añadido y en azul las cisteínas del dominio Tcys. (b y c) Detección de la proteína fluorescente GvpA1-Tcys-FLAsH en las cepas JV10 (AM1 *gvpA-Tcys*) y JV11 (AM1 $\Delta ctrA::hyg$ *gvpA-Tcys*) (d) Formación del complejo fluorescente Tcys-FLAsH.

Ensayos de flotabilidad

Considerando lo anterior, se evaluó el grado de flotabilidad de *R. sphaeroides* en las distintas cepas mencionadas. Teóricamente, la flotabilidad de aquellas cepas que no presentan vesículas de gas, según las observaciones al microscopio electrónico de transmisión, deberían tener una flotabilidad reducida, mientras que aquellas con vesículas de gas deberían ser capaces de mantenerse en la superficie de los cultivos.

Para ello se llevó a cabo un ensayo de flotabilidad, en el cual las cepas se crecieron en medio mínimo de Sistrom adicionado con casaminoácidos al 0.2% y agar al 0.15%. Los viales se incubaron recibiendo iluminación continua de forma lateral a una de las paredes durante 7 días sobre una superficie estática (Materiales y Métodos). Los viales se fotografiaron cada 24 h (Figura 15).

Las cepas mutantes en *ctrA*, AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) y JV8 (AM1 $\Delta ctrA::hyg gvpN::uidA-aadA$) que carecen tanto del Fla2 como de vesículas de gas, no fueron capaces de mantenerse cercanas a la superficie del medio, a diferencia de la cepa AM1. La cepa JV7 (AM1 $gvpN::uidA-aadA$), que no presenta vesículas de gas pero sí Fla2, de manera similar a las cepas mutantes en *ctrA*, fue incapaz de mantenerse cercana a la superficie. Con base en lo anterior, se puede atribuir el fenotipo de flotabilidad deficiente a la carencia de vesículas de gas en las cepas AE1 (*ctrA*⁻), JV8 (*ctrA*⁻ *gvpN*) y JV7 (*gvpN*). Debe mencionarse que la cepa JV7 (*gvpN*) mostró un mayor grado de turbidez a comparación de las mutantes en *ctrA* en la región comprendida entre la zona de crecimiento y la superficie del medio (Figura 15), lo que puede atribuirse a la presencia de un pequeño número de células a juzgar por la opacidad de la zona. Lo anterior podría ser explicado por la movilidad dada por la rotación del flagelo que favorecería que algunas células pudieran ocupar la parte superior del cultivo; esta posibilidad es reforzada por el hecho de que la cepa JV9 (AM1 $\Delta gvpN::uidA-aadA \Delta flbT::hyg$), que carece de vesículas de gas y de flagelo, ya no muestra la turbidez observada en la parte superior del cultivo de la cepa JV7 (*gvpN*).

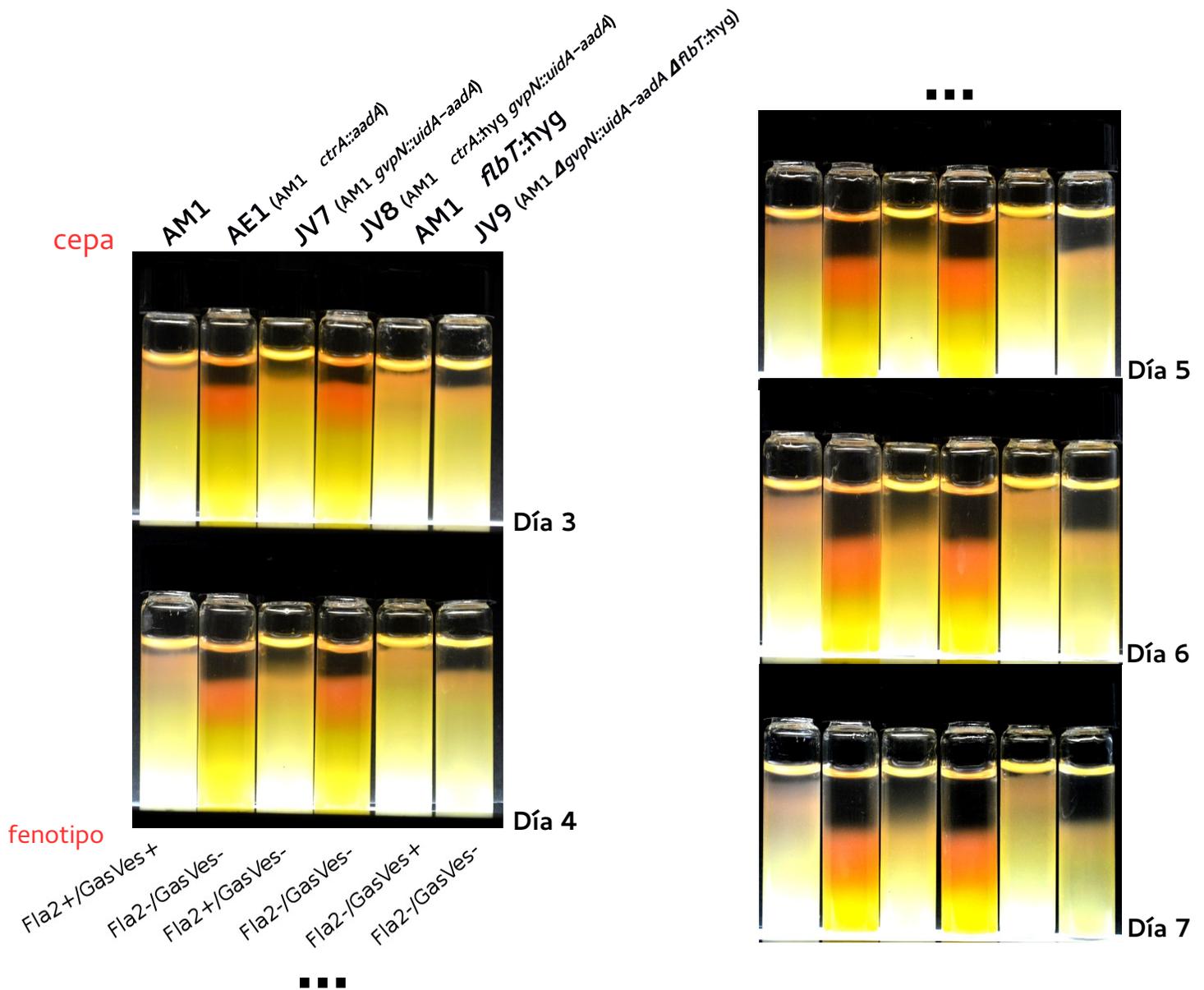


Figura 15. Ensayo de flotabilidad de las cepas AM1, AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$), JV7 (AM1 $gvpN::uidA-aadA$), JV8 (AM1 $\Delta ctrA::hyg gvpN::uidA-aadA$), AM1 $\Delta flbT::hyg$ y JV9 (AM1 $\Delta gvpN::uidA-aadA \Delta flbT::hyg$). En la parte superior se muestran las cepas, en la inferior el fenotipo de las respectivas cepas, mientras que del lado derecho se señala el tiempo transcurrido de crecimiento posterior a la inoculación

A partir del día 3 los diferentes fenotipos de flotabilidad son evidentes, pero se van exacerbando con el paso de los días.

Con la intención de evaluar si los fenotipos observados en el ensayo de flotabilidad eran reproducibles en un medio completamente líquido, considerando que en este ensayo se usa 0.15% de agar en el medio de cultivo (Materiales y Métodos), se realizó dicho ensayo para las cepas AM1 y AE1 en ausencia de agar, aeróbica y anaeróbicamente.

Congruente con lo esperado, se observó que al día 3 de incubación la cepa AM1 fue capaz de mantenerse en la superficie, mientras que su derivado AE1 empezó a precipitarse (Figura 16).



Figura 16. Cepas AM1 y AE1 (AM1 Δ *ctrA::aadA*) crecidas en medio SIS adicionado con 0.2% de C.A. sin agar (condición aeróbica y anaeróbica) durante 3 días.

Dado el largo periodo de incubación de los cultivos en el ensayo de flotabilidad, se consideró la posibilidad de que en estas condiciones en la cepa WS8N, que es la cepa parental de AM1, podría activarse de manera natural el sistema de dos componentes CckA/ChpT/CtrA y provocar así la flotación de la cepa silvestre. Es importante recordar que la cepa AM1 presenta la mutación L391F en *cckA*, la cual promueve una mayor autofosforilación de la proteína, lo que lleva finalmente a la activación de CtrA, a través de ChpT (Vega-Baray et al, 2015).

Para lo anterior se realizó un ensayo de flotabilidad utilizando a la cepa WS8N y sus derivados WS8N $\Delta ctrA::aadA$, WS8N $\Delta flgE1::aadA flaA::kan$ y WS8N $\Delta ctrA::aadA flgC1::kan$; así como a las cepas AM1 y AE1 (Figura 17).

Se observó que la cepa WS8N parece tener un fenotipo similar al de AM1; sin embargo, para poder evaluar únicamente el fenotipo dado por las vesículas de gas y considerando que dicha cepa expresa el flagelo Fla1, se evaluó a una cepa incapaz de ensamblar tanto el flagelo 1 como el flagelo 2 (WS8N $\Delta flgE1-flaA$). Parece ser que dicha cepa es capaz de flotar, ya que el límite superior de la zona que presenta células se encuentra por encima del límite observado en las cepas WS8N $\Delta ctrA-flgC1$ y AE1, las cuales son incapaces de ensamblar flagelos o vesículas de gas.

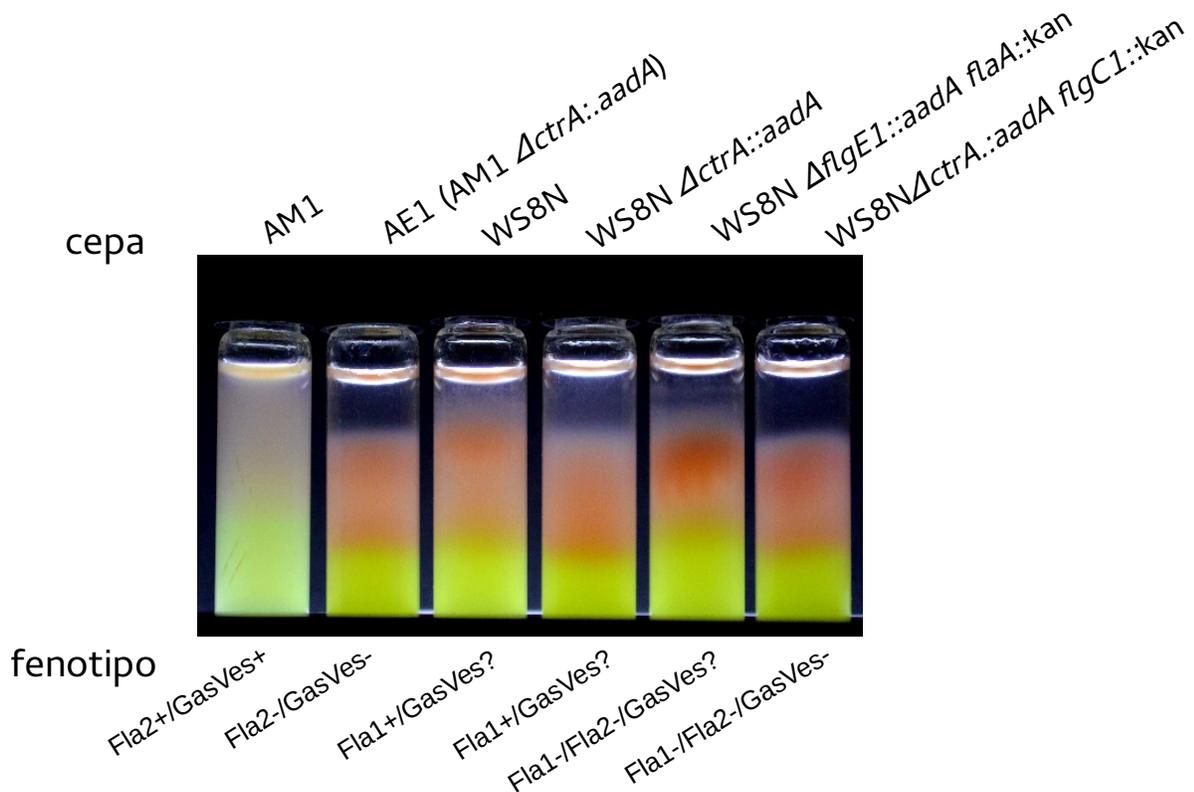


Figura 17 . Ensayo de flotabilidad de la cepa AM1, AE1 (AM1 Δ ctrA::aadA), WS8N, WS8N Δ ctrA::aadA, WS8N Δ flgE1::aadA flaA::kan y WS8N Δ ctrA::aadA flgC1::kan al día 7. Las cepas y sus respectivos fenotipos son indicados.

Tomando en cuenta que, bajo las condiciones de crecimiento probadas, CtrA parece ser el único regulador transcripcional de las vesículas de gas, se analizó a la cepa WS8N Δ ctrA-*flgC1* que sería incapaz de ensamblar a las VG y a cualquiera de los dos flagelos; el fenotipo de dicha cepa es similar al de la mutante AE1, lo que sugiere que WS8N está expresando VG y flotando gracias a ellas.

La expresión de las vesículas de gas en la cepa WS8N implicaría la activación de CtrA, por lo que se evaluó la presencia de la proteína del gancho flagelar FlgE2, cuya expresión depende de CtrA. Para ello se inmunodetectó en extractos celulares obtenidos de tres regiones del vial, correspondientes a la superficie, al fondo y a la región media, pensando en que pudiera haber una expresión diferencial de

CtrA a lo largo del vial. La cepa AM1 fue incluida en el experimento como control positivo, mientras que AE1 fue el control negativo (Figura 18).

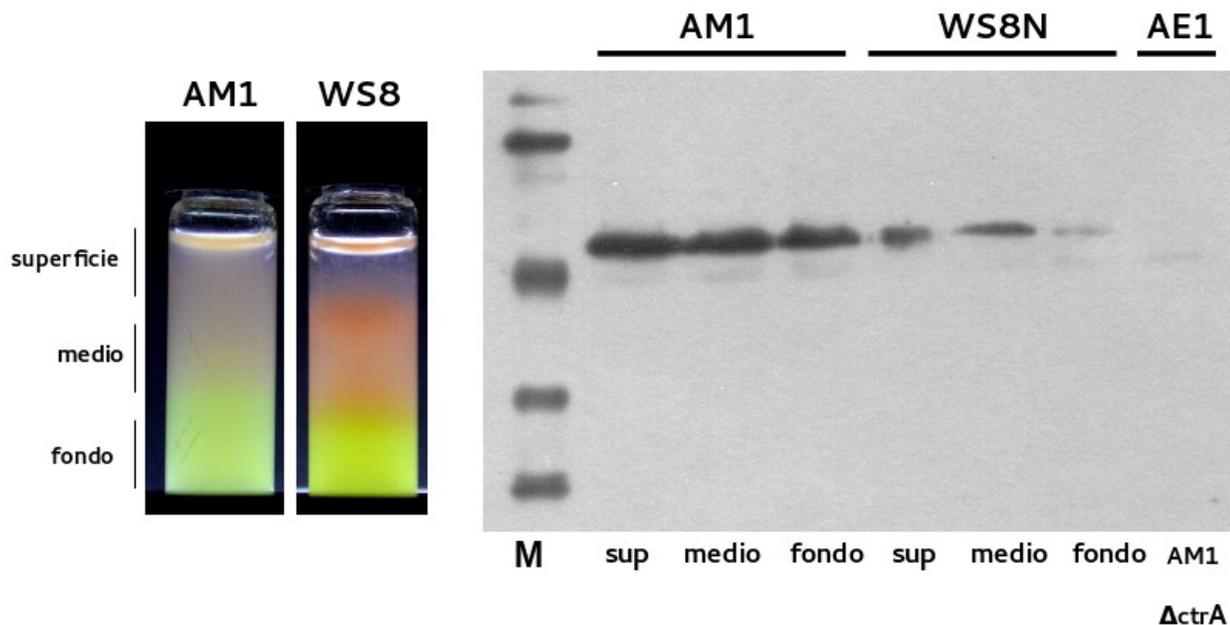


Figura 18. Western-blot anti FlgE2 de las cepas AM1 y WS8N crecidas durante 10 días en ensayo de flotabilidad. Fueron tomados extractos en tres diferentes puntos: superficie, medio y fondo. Fueron cargados 2 μ g de proteína.

Podemos observar que de acuerdo a lo esperado, FlgE2 es expresada en la cepa AM1 a todo lo largo del vial. Sorprendentemente FlgE2 se expresa también en la cepa WS8N, predominantemente en la superficie, decayendo su expresión hacia el fondo del vial. Lo anterior sugiere que CtrA está activa en aquellas células que expresaron la proteína del gancho FlgE2 en un fondo genético silvestre y por lo tanto las vesículas de gas deben también ser expresadas.

La capacidad de flotar de la cepa WS8N en el ensayo de flotabilidad así como su capacidad para expresar a la proteína flagelar FlgE2 indican que el sistema CtrA debe estar activo en dichas condiciones. Sin embargo, es importante señalar que el grado de expresión de la proteína flagelar en la

cepa WS8N parece ser mucho menor al detectado en la cepa AM1, de manera similar a la flotabilidad observada entre ambas cepas, lo que implicaría que el grado de activación de CtrA en la cepa silvestre sería menor al de AM1.

El aumento en la densidad poblacional, el estrés generado por la limitación de nutrientes o alguna otra señal podrían ser las responsables de desencadenar la activación de CtrA en la cepa silvestre.

CtrA regula negativamente la producción de pigmentos fotosintéticos

De los resultados del RNA-seq fue evidente que CtrA regula negativamente algunos de los genes del complejo fotosintético a diferentes niveles: síntesis de bacterioclorofila y carotenos, complejos antena, centro de reacción y reguladores transcripcionales (Figura 19). Como apoyo a este apartado, en la sección de anexos se presenta un panorama general de la fotosíntesis en *R. sphaeroides* para su consulta (Anexo 1).

Dado que algunos de los genes involucrados en la síntesis de los complejos antena, bacterioclorofila y carotenos son regulados negativamente por CtrA, se determinó si la presencia de los complejos fotosintéticos se encontraba afectada de la misma manera. Por ello se obtuvieron los espectros de absorción de las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$); así como de la cepa AM1 pRK415 *ctrA*, en la cual podría observarse una represión exacerbada de dichos complejos (Figura 20).

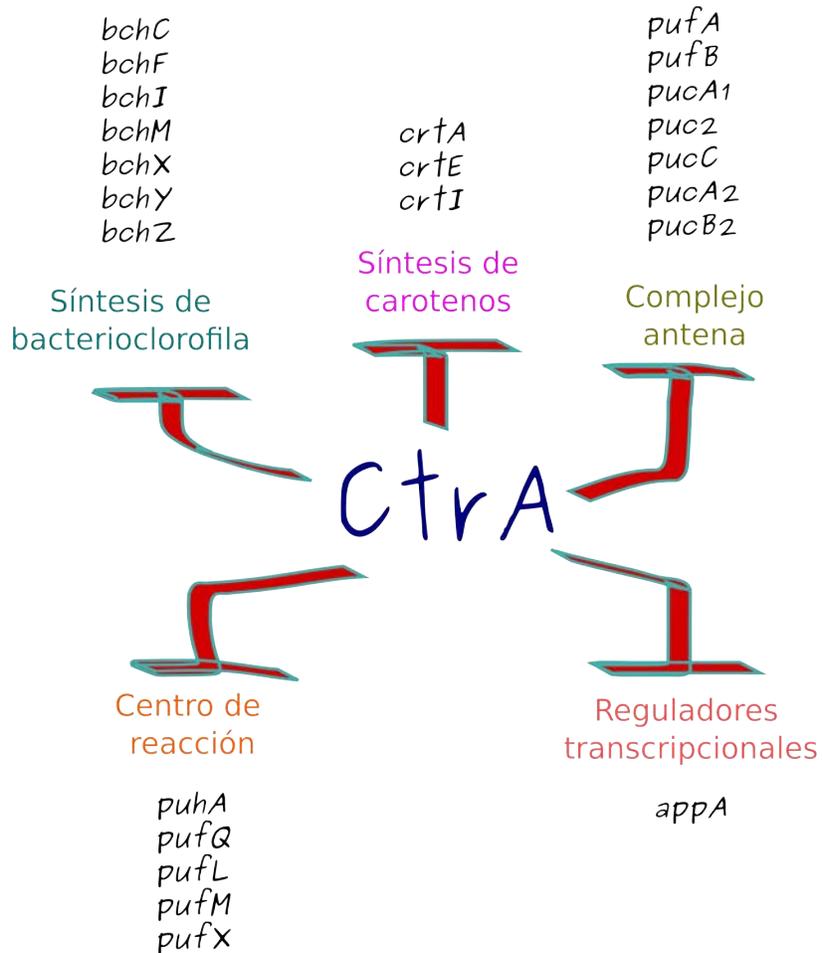


Figura 19. Genes fotosintéticos regulados negativamente por CtrA en *R. sphaeroides*.

En *R. sphaeroides* la bacterioclorofila puede encontrarse en su forma libre absorbiendo a 770 nm o asociada a las proteínas del complejo antena II (PucA y PucB) formando complejos que absorben a 800 y 850 nm (B800 y B850) o con las proteínas del complejo antena I (PufA y PufB) formando el complejo B875. Así mismo, los carotenos esferoideno y esferoidenona también forman parte de los complejos B800, B850 y B875. De este modo podrían esperarse cambios en estas regiones del espectro entre las cepas analizadas (Yeliseev et al, 1996).

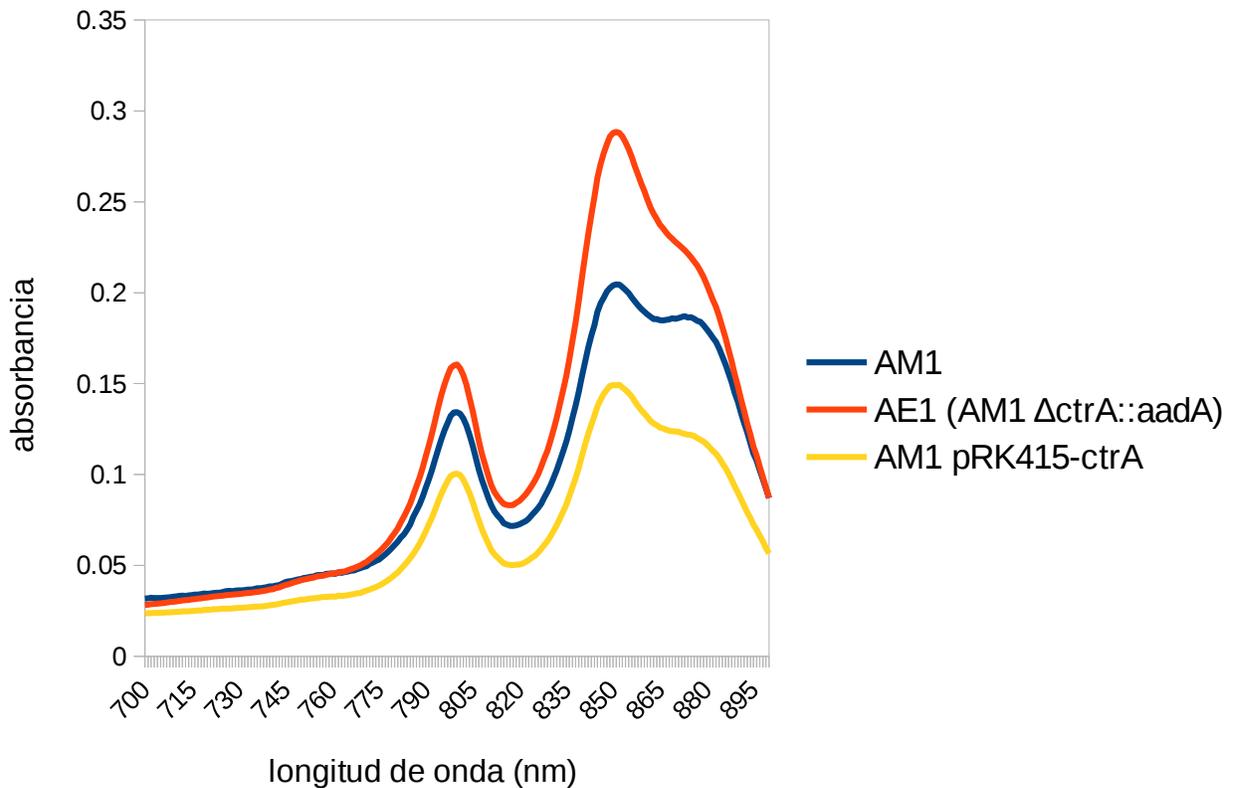


Figura 20. Espectros de absorción de 700 a 900 nm de longitud de onda de extractos totales de cepas crecidas en medio SIS con 100uM de ácido succínico en presencia de luz durante 48 h. Son indicados los complejos antena B800, B850 y B875. La comparación entre los espectros de la cepa AM1 y AM1 con el vector pRK415 vacío se muestra en el anexo 6.

Conforme a lo esperado, la mutante AE1 mostró un importante incremento en la cantidad de pigmentos B800, B850 Y B875, muy probablemente debido a la pérdida de la represión transcripcional dada por CtrA. A su vez, la cepa AM1 pRK415 *ctrA* mostró una clara disminución para ambos pigmentos, lo que puede deberse a que un incremento de CtrA en la célula conduce a una mayor represión de dichos genes fotosintéticos. La cepa AM1 pRK415 mostró el mismo comportamiento que la cepa AM1 (Anexo 6), lo que implica que la disminución en la producción de los pigmentos fotosintéticos evaluados es debida a la copia extra de *ctrA* expresándose en trans y no a la presencia del plásmido pRK415.

La formación de biopelícula es dependiente de CtrA

Como se mencionó previamente, con la finalidad de demostrar que *R. sphaeroides* es capaz de flotar en un medio completamente líquido (en ausencia de agar), las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) se crecieron en SIS sin succínico adicionado con 0.2% de casaminoácidos, como en el ensayo de flotabilidad pero sin adicionar agar. Conforme a lo que se esperaba, al día 3, la cepa AM1 fue capaz de mantenerse distribuida a todo lo largo del vial, ya sea dejando una pequeña cantidad de aire en el vial o en su ausencia, mientras que la cepa AE1 comenzó a precipitarse (Figura 16). Sorprendentemente, al día 7, dichos cultivos mostraron un fenotipo completamente distinto. La cepa AM1 formó un agregado en el fondo del vial, en cualquiera de las dos condiciones, mientras que la cepa AE1 no fue capaz de tener la misma respuesta; dicho agregado celular mostró una consistencia viscosa, que era capaz de mantenerse en dicho estado aún después de invertir el vial. La adhesión al vial era muy débil, en comparación a la mostrada por el agregado celular.

Lo anterior llevó a plantear la posibilidad de que dicho agregado fuera una biopelícula tipo flóculo, diferente al previamente descrito para *R. sphaeroides*, el cual se observó en la superficie de cultivos estáticos (Wilkinson et al, 2011). Como apoyo a este apartado, en la sección de anexos se presenta un panorama general de las biopelículas para su consulta (Anexo 3).

El cristal violeta (CV) es un colorante ampliamente utilizado en la tinción de biopelícula (O'toole, 2011). Su carácter básico le permite unirse a moléculas de carga negativa, tiñendo por lo tanto a las bacterias y a la matriz extracelular que las recubre en la biopelícula. Por ello se decidió teñir el agregado celular observado en el fondo de los viales de AM1 y a las células no agregadas de la mutante en *ctrA*, para poder tener una idea de la cantidad de matriz presente entre ambas cepas. Considerando las características de adherencia previamente señaladas para el agregado formado por AM1, se realizaron algunas modificaciones a los protocolos de tinción de biopelícula que se realizan para bacterias como *Pseudomonas* (Materiales y Métodos).

Las células teñidas fueron observadas al microscopio confocal. Podemos observar las micrografías correspondientes a campo claro, autofluorescencia en rojo (dada por los pigmentos fotosintéticos) y merge, para ambas cepas. Así mismo el CV retenido por las cepas AM1 y AE1 durante la tinción, fue lavado con DMSO al 100% y determinada la absorbancia a 595 nm (Figura 21).

Como se puede observar, la cepa AM1 forma agregados celulares en los cuales las células parecen estar embebidas en una matriz, mientras que las células de la cepa mutante en *ctrA* no se encuentran agregadas. En cuanto a la cuantificación de CV, la cepa AM1 retuvo alrededor de 20 veces más CV que la mutante en *ctrA*, lo que debe ser causado por los componentes extracelulares en los cuales se encuentran embebidas las células de la cepa AM1.

Lo anterior indica que *R. sphaeroides* es capaz de formar un biopelícula tipo flóculo en el fondo de los viales a partir del día 7, y que la formación de dicha estructura depende de la presencia de CtrA.

Se ha descrito que *R. sphaeroides* presenta un posible sistema de percepción de quórum en el cual la proteína CerI (ortólogo de LuxI) produce el autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecenoil) homoserin lactona (Puskas et al, 1997). Por lo que se decidió evaluar la capacidad de una cepa mutante en *cerI* (previamente generada en el laboratorio) para formar el biofilm descrito. Como apoyo a este apartado, en la sección de anexos se presenta un panorama general de la respuesta detectora de quórum para su consulta (Anexo 3).

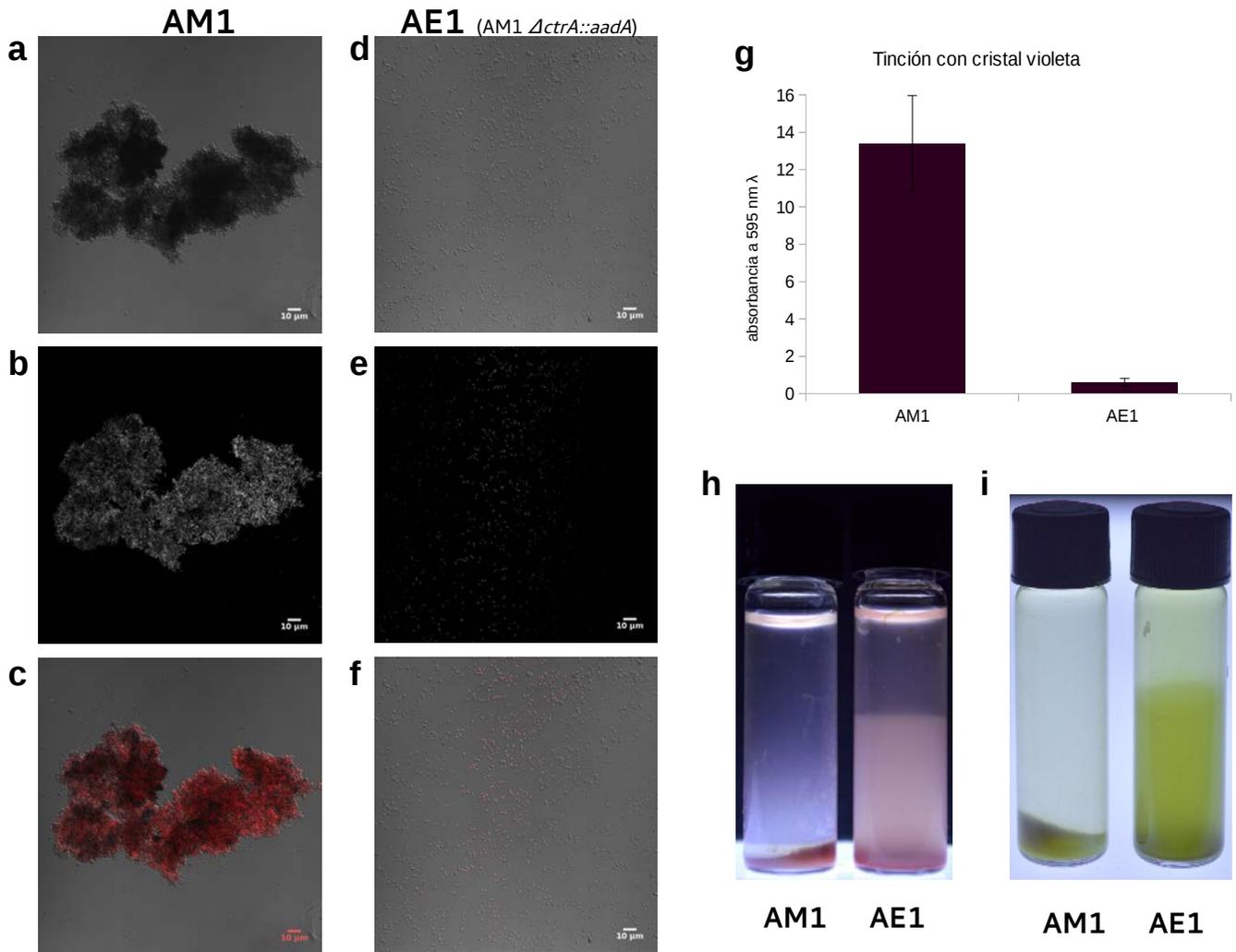
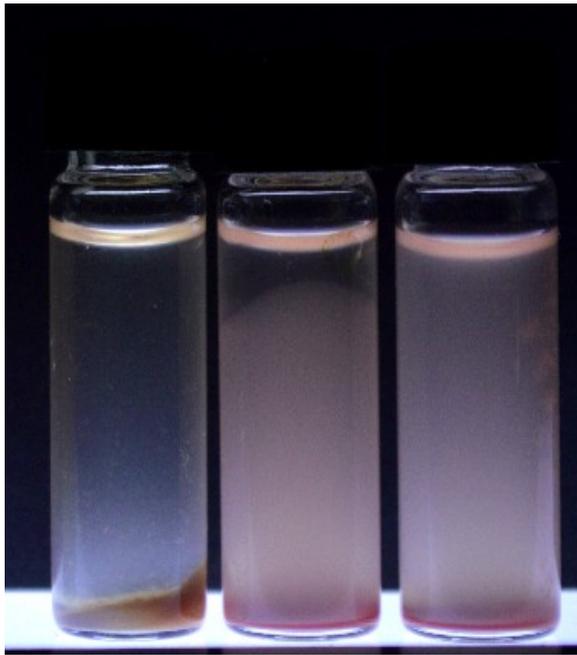


Figura 21. CtrA regula la formación de biofilm que se deposita en el fondo de los viales. Microscopías confocales de las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) crecidas en medio SIS adicionado con 0.2% de C.A. durante 7 días aneróbicamente en presencia de luz constante y teñidas con cristal violeta: campo claro (a,d), autofluorescencia en rojo (b,e) y merge (c,f). (g) Absorbancia a 595 nm del cristal violeta retenido por las cepas AM1 y AE1, la diferencia entre ambas cepas es significativa (prueba de t no pareada, $p < 0.001$). (h-i) *R. sphaeroides* crecida en medio SIS adicionado con 0.2% de C.A. durante 7 días aeróbica (izquierda) o aneróbicamente (derecha) en presencia de luz constante.

Como podemos apreciar, la cepa AM1 $\Delta cerI$ al día 7 comienza a formar biopelícula en el fondo del vial, pero de forma muy deficiente en comparación a su cepa parental AM1 (Figura 22), por lo que se puede asumir que el aumento en la densidad poblacional detectado a través de un sistema de quórum es en gran medida responsable de detonar la formación de biopelícula.



AM1

AE1
(AM1
 $\Delta ctrA::aadA$)

AM1
 $\Delta cerI::aadA$

Figura 22. El sistema detector de quórum está involucrado en la formación de biofilm en *R. sphaeroides*. Las cepas fueron crecidas en medio SIS adicionado con 0.2% de C.A. sin agar durante 7 días.

Discusión

Regulón CtrA en *R. Sphaeroides*

La actividad regulatoria global de CtrA en *R. sphaeroides* se analizó mediante RNA-seq. Se determinó que el regulón está conformado por 321 genes, de los cuales 239 son regulados de forma positiva, mientras que 82 son regulados negativamente (Figura 23 y Anexo 7). Es importante señalar que dicho estudio se llevó a cabo con muestras obtenidas de cultivos creciendo en condición fotoheterotrófica con 100µM de ácido succínico como fuente de carbono durante 16 h, en la que los cultivos no alcanzaron una D.O. mayor a 0.3. Dado que se ha reportado que CtrA en *R. capsulatus* puede regular grupos de genes específicos dependiendo de las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento, el regulón de dicho factor transcripcional en *R. sphaeroides* podría ser mayor.

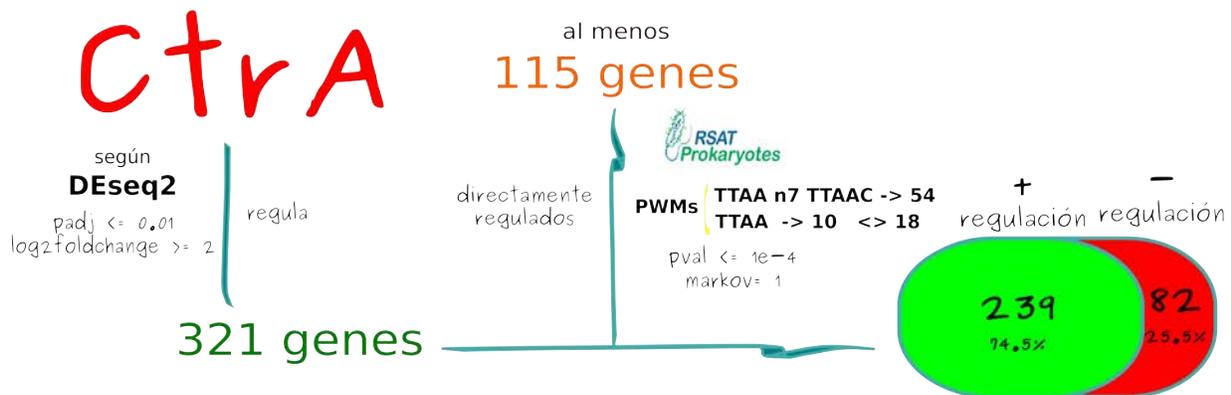


Figura 23. Resultados del análisis de expresión diferencial usando la paquetería de expresión diferencial DESeq2, así como la propuesta de genes directamente regulados usando PWMs para la búsqueda de posibles sitios de unión mediante el programa "Matrix scan quick and simple" de RSAT.

La regulación transcripcional mediada por CtrA para los genes *terminasa*, *gvpN* y el promotor *pucB* se validó mediante el uso del gen reportero *uidA*, el cual codifica para la β -glucuronidasa (Figura 12). La consistencia en la actividad transcripcional de dichos genes, según ambas aproximaciones, permite validar los resultados obtenidos por el RNA-seq.

La búsqueda *in silico* de motivos de unión a CtrA en las regiones regulatorias de dichos genes sugiere que al menos 115 estarían regulados de forma directa, ya sea por cajas completas o medias (Figura 10; Anexo 8); sin embargo, dichos resultados deben tomarse con mucha cautela, considerando que dicho análisis solamente es bioinformático y que la determinación de operones usada en este trabajo sólo considera la distancia entre genes y el sentido de la transcripción (Materiales y Métodos).

A pesar de que CtrA no es esencial para *R. sphaeroides* (Vega-Baray et al, 2015), nuestros resultados muestran que regula genes que podrían ser importantes para la respuesta de esta bacteria a determinados ambientes, encontrándose los siguientes grupos de genes: flagelares *fla2*, quimiotácticos, vesículas de gas, pili, agente de transferencia de genes RsGTA, respuesta a estrés, metabolismo de c-di-GMP, transporte y metabolismo de sustratos, reguladores transcripcionales, factores sigma, sistema regulatorio CtrA, fotosíntesis y fijación de carbono.

Adicionalmente, se generó una clasificación funcional usando categorías COG, que nos permitió agrupar al regulón CtrA en categorías como producción y conversión de energía (C), motilidad celular (N) y mecanismos de transducción de señales (T), por mencionar algunos (Figura 11). El análisis anterior indica que la función celular motilidad (N), que contiene a los genes flagelares 2, es la que presenta el mayor número de genes, siguiéndole la categoría de genes de función desconocida (S), de mecanismos de transducción de señales (T) y producción y conversión de energía (C).

El hecho de que la función de motilidad (N) sea la más enriquecida en nuestro análisis hace sentido con el hecho de que sea la función celular regulada por CtrA más ampliamente distribuida en las α -

Proteobacterias (Brilli et al 2010, Mercer et al, 2010; Greene et al, 2012).

Una curación manual de las categorías función desconocida (S) y predicción de función general (R) fue necesaria para evitar que genes de los cuales sí se conoce su función de forma experimental o para los cuales existen homólogos de función conocida en otras bacterias no quedaran dentro de dichas categorías. Tal fue el caso de los genes de vesículas de gas, que en su mayoría estaban agrupados en el grupo función desconocida (S). Particularmente para este grupo de genes se decidió crear una nueva categoría llamada "GasV", ya que a pesar de que puede considerarse a dichos genes como parte de la función motilidad, como se discutirá más adelante, aún no existe consenso por parte de la comunidad.

El mapa de calor generado (Figura 10) permite no sólo visualizar los cambios en la expresión de genes entre las cepas AM1 y AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$), sino también entre los genes del regulón, ya que el método de normalización de reads utilizado fue el de FPKMs (fragmentos alineados al gen / tamaño del gen en kilobases/ millones de reads mapeados) que como vemos considera el tamaño de los genes. Así mismo, el mapa de calor nos permite visualizar que algunos genes son fuertemente dependientes de CtrA para expresarse (ver categorías a y c del heatmap), mientras que para otros CtrA parece regular parcialmente su expresión. Los valores de corte de FPKMs para definir dichas categorías se generaron a partir de los valores de FPKM de los genes flagelares *fla2*, que sabemos dependen de la presencia de CtrA para poder expresarse (Materiales y Métodos). A pesar de que dicha clasificación nos da una idea del grado en el que CtrA regula la actividad transcripcional de sus genes blanco debe considerarse la existencia de otros factores que regulan coordinadamente su actividad. Dicho esto, los genes de las categorías a y c, aunque parecen ser regulados exclusivamente por CtrA, también podrían serlo por otros reguladores, mientras que para las categorías b y d parece ser que CtrA es uno de los reguladores que modulan su transcripción.

El mostrar los posibles sitios de unión a CtrA en el mapa de calor permite visualizar que no existe una correlación entre el tipo de motivo de unión (completo o medio) y el tipo de regulación de dicho gen

(positiva o negativa), teniendo así, por ejemplo, que los genes de fotosíntesis que son regulados negativamente por CtrA, parecen ser regulados tanto por motivos completos y medios.

Los genes quimiotácticos contenidos en la categoría "T", mostraron algunos patrones de expresión inesperados. *R. sphaeroides* presenta tres operones quimiotácticos: **cheOp1** (*cheY5, mcpB, tlpS, mcpA, cheD, cheX, cheY1, cheA1, cheW1, cheR1, cheY2*), **cheOp2** (*cheY3, cheA2, cheW2, cheW3, cheR2, cheB1, tlpC*) y **cheOp3** (*cheA4, cheR3, cheB2, cheW4, ppfA, tlpT, cheY6, cheA3*), así como el locus **cheY4-mcpG**. Se sabe que la respuesta quimiotáctica del flagelo Fla1 está mediada por las proteínas codificadas por los operones *cheOp2, cheOp3* y *cheY4-mcpG*, mientras que el sistema flagelar Fla2 es controlado por los productos del *cheOp1* (Porter et al, 2006; del Campo et al, 2007). Posteriormente se describió que los reguladores maestros FleQ y CtrA de los sistemas flagelares Fla1 y Fla2 respectivamente, regulan la expresión de sus respectivas proteínas quimiotácticas (Hernández-Valle et al, 2017), es decir, CtrA regula la expresión del *cheOp1*, cuyos productos controlan la rotación del flagelo 2.

Nuestro análisis transcriptómico muestra que CtrA efectivamente activa la expresión de los genes flagelares *fla2* y del operón quimiotáctico *cheOp1* pero que además regula positivamente la expresión del *cheOp2* y a los genes *mcpV, mcpJ, mcpR* y *tlpL*. Es importante mencionar que previamente había sido reportado que la expresión del *cheOp2* es parcialmente dependiente de FliA (sigma 28, que a su vez depende de FleQ), y mayoritariamente de sigma 70 (Hernández-Valle et al, 2017). La regulación positiva del *cheOp2* por CtrA así como de los receptores *mcpV, mcpJ, mcpR* y *tlpL*, implicaría que los complejos quimiotácticos en una cepa con CtrA activa, presentarían más elementos de los que se pensaba, lo que podría traducirse en un control quimiotáctico del Fla2 más complejo del previamente reportado. Sin embargo, aún hace falta confirmar que dichos transcritos sean traducidos y que se encuentren conformando los complejos quimiotácticos.

Hasta el momento no se ha descrito que *R. sphaeroides* sea capaz de ensamblar un pili, a pesar de que

presenta genes que permitirían la producción y ensamblaje de un pili tipo Tad/CpA. CtrA regula positivamente la transcripción de los genes *cpaE*, *cpaF*, *tadB*, *tadC* y *cpaA* y de los ORFs RSWS8N_14755, RSWS8N_14745 que se encuentran dentro de un conjunto de 8 genes, posiblemente implicados en la formación de esta estructura. Es importante mencionar que el pili tipo Tad/Cpa comparte similitud con los sistemas de secreción tipo II y IV. En *C. crescentus* dicho pili permite entre otras cosas la infección por fagos, la adhesión a superficies y la maduración de la biopelícula. En otras bacterias se ha asociado a la motilidad por “twitching”, en la cual la célula mediante la extensión, asociación a un sustrato y la retracción del pili puede desplazarse sobre superficies (Mignolet et al, 2018; Entcheva-Dimitrov & Spormann, 2004). Hasta ahora, las observaciones que se han realizado mediante microscopía electrónica de transmisión en nuestro grupo de trabajo no han permitido visualizar dicha estructura. De estar presente, quedaría por dilucidar si tiene un papel en la fisiología de esta bacteria.

R. sphaeroides presenta algunos homólogos del sistema CtrA descritos en *C. crescentus*, que modulan la actividad de CtrA a nivel de transcripción, fosforilación y proteólisis. A nivel transcripcional se encuentra SciP. Dentro de los reguladores de la actividad de CckA y por lo tanto de la fosforilación de CtrA están PleC, PleD y DivL, mientras que a nivel de proteólisis está ClpP. Aún queda por dilucidar si su función es similar a la de sus homólogos, de los cuales *ctrA*, *sciP* y *clpP* son parte del regulón CtrA en *C. crescentus* (Laub et al, 2002; Zhou et al, 2015), mientras que *sciP*, *cckA*, *pleC*, *pleD*, *divL* y *clpP* son regulados por CtrA en *R. sphaeroides* (Anexo 7).

La regulación positiva de los genes implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos y poliaminas podría tener alguna relación con el encendido del sistema CckA/ChpT/CtrA, pensando en que la ausencia de dichas moléculas podrían estimularlo; sin embargo, la activación de dichos genes podría ser derivada del encendido del sistema.

Respecto al metabolismo de carbohidratos, 4 genes implicados en el transporte de azúcares están

regulados negativamente, lo que podría implicar que la entrada a la célula de ciertos carbohidratos se regularía de la misma manera. El hecho de que los genes de fijación del carbono *cbb* presenten el mismo tipo de regulación, no deja claro si la presencia o ausencia de alguna fuente de carbono en particular (compuestos de carbono reducidos o CO₂) estuviera involucrada en la activación del sistema CckA/ChpT/CtrA.

Con base en nuestros resultados, podemos decir que CtrA permite desencadenar una respuesta robusta a estrés. Dentro de los genes implicados en dicha respuesta están los homólogos de los factores anti-sigma RsbW y anti-anti-sigma RsbV que median la actividad del factor sigma B en *Bacillus subtilis* durante crecimiento estacionario, por ejemplo, tras una caída de los niveles de ATP; de acuerdo a nuestros resultados, dichos factores están regulados por CtrA y también en *R. capsulatus*, en la que regulan la transcripción del agente de transferencia de genes RcGTA en la misma fase de crecimiento (Mercer & Lang, 2014). Entre los genes regulados por CtrA se encontró un homólogo del factor antisigma RsiW que regula la actividad del factor sigma SigW en *B. Subtilis* (Schöbel et al, 2004), cuyo regulón es inducido por estrés como choque alcalino, choque osmótico, infección por fagos y antibióticos. En concordancia, la regulación negativa de este factor concuerda con una incrementada respuesta a estrés, pensando que en *R. sphaeroides* esta proteína reprime la actividad de algún factor sigma implicado con la respuesta a estrés.

Adicionalmente ha sido descrito para *R. sphaeroides* que el factor sigma RpoHI, cuyo gen es activado por CtrA, es capaz de mediar la respuesta a estrés calórico y en menor medida estrés fotooxidativo (Nuss et al, 2010). En congruencia con lo anterior ha sido mostrado que el complejo proteico que auxilia al plegamiento de proteínas durante estrés formado por GroES y GroEL, cuyos genes también son regulados positivamente por CtrA, es regulado transcripcionalmente por RpoHI (Green & Donohue, 2006); lo anterior y la ausencia de posibles sitios de unión a CtrA en la región regulatoria de *groES* y *groEL* (Anexo 8) sugieren que sean parte del regulón indirecto de CtrA.

Además, el gen *gshB* que codifica a una glutatión sintetasa y cuyo producto, el glutatión, se ha visto implicado en la respuesta a estrés fotooxidativo en esta bacteria (Nuss et al, 2009), es regulado

positivamente por CtrA, así como los genes *recA*, *recQ*, *radC*, que han sido implicados en la reparación del daño al DNA.

Lo anterior, sugiere fuertemente que CtrA puede activarse bajo condiciones de estrés, como estrés nutricional, estrés calórico o estrés fotooxidativo o que dicha respuesta permita contender contra el estrés generado después de su activación.

CtrA regula positivamente la flotabilidad mediada por vesículas de gas (VG)

Nuestros resultados demuestran que la expresión de los genes de las VG es dependiente de CtrA y que dichas estructuras le confieren a *R. sphaeroides* la capacidad de flotar en medio líquido como se ha visto en bacterias como *Serratia sp.* ATCC 39006 (Tashiro et al, 2016) y *Microcystis sp.* FACHB 930 (Gao et al, 2016) y en arqueas como *Halobacterium salinarium* (Stoeckenius and Kunau, 1968), o en medio ligeramente viscoso, en presencia de 0.15% de agar, lo cual tiene sentido, teniendo en cuenta que *R. sphaeroides* es una bacteria acuática a diferencia de bacterias terrestres como *Streptomyces coelicolor* (Lee et al, 2005) y *Bacillus megaterium* (Li and Cannon, 1998) en las cuales las VG podrían estar implicadas en otros mecanismos celulares como la resistencia a estrés osmótico o esporulación.

El hecho de observar VG en la cepa AM1 crecida en el ensayo de flotabilidad (Anexo 5), nos permite aseverar que el fenómeno observado en dicho ensayo es debido a la flotabilidad conferida por las VG.

Es importante señalar que en ausencia de flagelo Fla2 pero en presencia de VG, en la cepa AM1 $\Delta flbT$ (Fla1-Fla2-VG+) la flotabilidad no se ve afectada, lo que indica que las VG son suficientes para permitir la flotabilidad a esta bacteria. Por otro lado, la cepa JV7 (*gvpN*; Fla1-Fla2+VG-) que carece de VG pero presenta al flagelo Fla2, es capaz de posicionarse en la región superior de la columna de agua aunque muy deficientemente, lo cual se va haciendo cada vez más pronunciado con el paso del tiempo (Figura 15). Lo que sugiere que las VG son indispensables para la flotabilidad en *R.*

sphaeroides y que por lo tanto la flotabilidad podría considerarse como un mecanismo de motilidad en esta bacteria.

En cianobacterias el desplazamiento vertical en la columna de agua es dado por las vesículas de gas, cuya regulación está dada principalmente por la luz. Se sabe que la luz regula positivamente la expresión de estas estructuras existiendo una correlación positiva con el incremento de la intensidad luminosa hasta cierto punto límite de intensidad, permitiéndoles alcanzar niveles superiores en la columna de agua durante el día (Deacon and Walsby, 1990). Posteriormente, los carbohidratos sintetizados y almacenados, incrementan la densidad celular permitiéndoles descender (Kromkamp and Mur, 1984). La ausencia de flagelo en cianobacterias podría explicar el porqué las VG son el mecanismo esencial de motilidad en este grupo.

Como se mencionó con anterioridad, hasta el momento, la regulación transcripcional de las VG sólo había sido reportada en *H. salinarium*, en el que GvpD funciona como un activador transcripcional y GvpE como su represor; y en *Serratia sp.* ATCC 39006, donde las proteínas GvrABC son requeridas para la completa transcripción del gen *gvpA1*. En las α -Proteobacterias, hasta el momento, las únicas bacterias en la que ha sido documentada la presencia de VG mediante MET es en *Octadecabacter articus* y *Octadecabacter antarticus* (Gosink et al, 1997) pertenecientes a la familia Rhodobacteraceae. Además, ha sido descrito en *R. capsulatus* que CtrA regula a nivel transcripcional a los genes de VG. A pesar de ello, no había sido mostrada la expresión de dichas estructuras, ni si pudieran tener algún papel en la flotabilidad en *R. capsulatus* (Mercer et al, 2010). El presente trabajo, además de mostrar que los genes de VG en *R. sphaeroides* también son regulados por CtrA y que dichas estructuras están presentes en la célula, demuestra que le confieren flotabilidad, aspecto que no había sido descrito en ninguna otra α -proteobacteria.

En general, la función de los diferentes genes de VG en la expresión, ensamblaje y degradación de estas estructuras ha sido muy pobremente caracterizado tanto en bacterias y arqueas, como se

describe en el Anexo 2. *R. sphaeroides* no es la excepción, saltando a la vista el marco de lectura RSWS8N_19454, que se encuentra dentro del operón de VG, del cual no existen homólogos en otras bacterias, más que en algunas Rhodobacteraceae, como *Rhodovulum sp.* P45 y *Rhodobacter johrii*, en las que las VG no han sido estudiadas.

Entender las señales ambientales que detonan la expresión y degradación de las VG en *R. sphaeroides* puede ser una vía por la cual explorar la activación y apagado del sistema CtrA, considerando que CtrA es el único o principal regulador de las VG. Hasta el momento se han descrito una amplia lista de factores ambientales involucrados en la expresión de las VG: en *Microcystis sp.* la intensidad luminosa regula positivamente la expresión de las VG, habiendo una correlación positiva entre su expresión y el incremento de la intensidad de luz; de forma similar, un incremento en el pH las favorece, alcanzando su mayor expresión a pH 10 (Deacon and Walsby, 1990; Gao et al, 2016). En la arquea *Haloferax mediterranei*, la anaerobiosis inhibe su expresión y ensamblaje; mientras que a mayor concentración de sal en el medio, mayor es la expresión de estas estructuras (Hechler and Pfeifer, 2009). En *Halobacterium salinarium* bajas temperaturas (15°C) estimulan la expresión de las VG, mientras que altas temperaturas (37 - 49°C) las inhiben. En la gama-proteobacteria *Serratia sp.* el sistema de percepción de quórum regula su expresión, teniendo que un incremento en la densidad poblacional detona la expresión de las VG a través del autoinductor BHL (N-butanoyl-L-homoserin lactona) de esta bacteria (Ramsay et al, 2011). Debemos considerar que la expresión y degradación de estas estructuras podría permitir a estos organismos acceder a ambientes favorables y alejarse de aquellos desfavorables, tal como ocurre con la taxis mediada por el flagelo y su respectivo sistema quimiotáctico.

CtrA es un regulador negativo de fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso altamente regulado en *R. sphaeroides*. A nivel transcripcional, los genes de fotosíntesis son regulados principalmente por la disponibilidad de oxígeno y luz, ésto mediante los

sistemas regulatorios AppA/PpsR y PrrB/PrrA (Jäger et al, 2007), así como por otros reguladores como MppG y Osp (Imam et al, 2014; Oh et al, 2003) (Anexo 1).

Durante condiciones de crecimiento fotosintético anoxigénico el regulador AppA se encuentra en su forma activa, inhibiendo la actividad represora de PpsR sobre los genes fotosintéticos por su unión a éste. Además, PprA se vuelve activo, incrementando la expresión tanto de los genes fotosintéticos como la de los operones de fijación de carbono *cbbI* y *cbbII*. Simultáneamente el represor MppG regula negativamente la expresión de los genes de los fotopigmentos (Imam et al, 2014; Uchino & Yakota, 2003).

Dado que el análisis transcriptómico llevado a cabo en este trabajo se realizó bajo una condición anaeróbica fotosintética, se esperaría que el sistema regulatorio de los genes de fotosíntesis en nuestro experimento fuera muy similar al recién mencionado, aunque debemos considerar que la fuente de carbono usada en los distintos trabajos no es la misma. Por lo anterior, el papel de CtrA en dicha regulación podría ser la de un regulador negativo, que modularía la regulación positiva de los genes *bch*, *crt*, *puc*, *puf* y *puhA* dada por AppA y PrrA y de los operones *cbbI* y *cbbII* dada por PrrA (Figura 24).

Es sabido que la energía producida por las reacciones de fotosíntesis en forma de ATP y NADPH es usada en las reacciones del ciclo de Calvin para la reducción de CO₂, lo que implica una coordinada y fina expresión de los genes de fotosíntesis y fijación de carbono (Cox & Nelson, 2000), que puede verse en este caso en la regulación positiva de dichos genes por el factor PrrA y de su regulación negativa por CtrA. Lo anterior podría verse como un mecanismo transcripcional que permite modular la expresión de ambos sistemas, seguramente para mantener un estado redox celular equilibrado.

Por otro lado, la proteína Osp regula positivamente la expresión de los genes *puc*, *puf*, *puhA*, *bchC* y *bchF* muy posiblemente de forma indirecta (Oh et al, 2003). Lo que salta a la vista es el hecho de que en ausencia de CtrA donde la expresión de *osp* se vería reducida, la actividad transcripcional de los genes fotosintéticos se incrementa. Lo anterior podemos explicarlo por la regulación positiva de los

sistemas PrrA/PrrB y AppA/PpsR sobre los genes de fotosíntesis, que en las condiciones en las que se llevó a cabo el análisis transcriptómico se vería muy favorecida. Lo cual podría entenderse como un enmascaramiento de fenotipos; sin embargo, es necesario trabajo experimental para esclarecer este fenómeno.

Los operones *pucBAC*, *bchFNBHLM*, *ctrA-bchIDO*, *crtIB*, *crtEF*, *bchCXYZ* y *pufKBALMX* parecen ser regulados directamente por CtrA según nuestro análisis *in silico*, ya sea por cajas completas o medias cajas (Figuras 10, 24 y Anexo 8), lo que refuerza los resultados del análisis transcriptómico para estos genes, que indica que la mayoría de los genes contenidos en estos operones son regulados negativamente por CtrA. Además, CtrA es capaz de regular la transcripción de *appA* de forma negativa, lo que implicaría que la disminución de AppA promovería la represión de PpsR sobre la transcripción de los genes de fotosíntesis. Lo anterior podría implicar que CtrA regula directa e indirectamente la expresión de los genes del fotosistema.

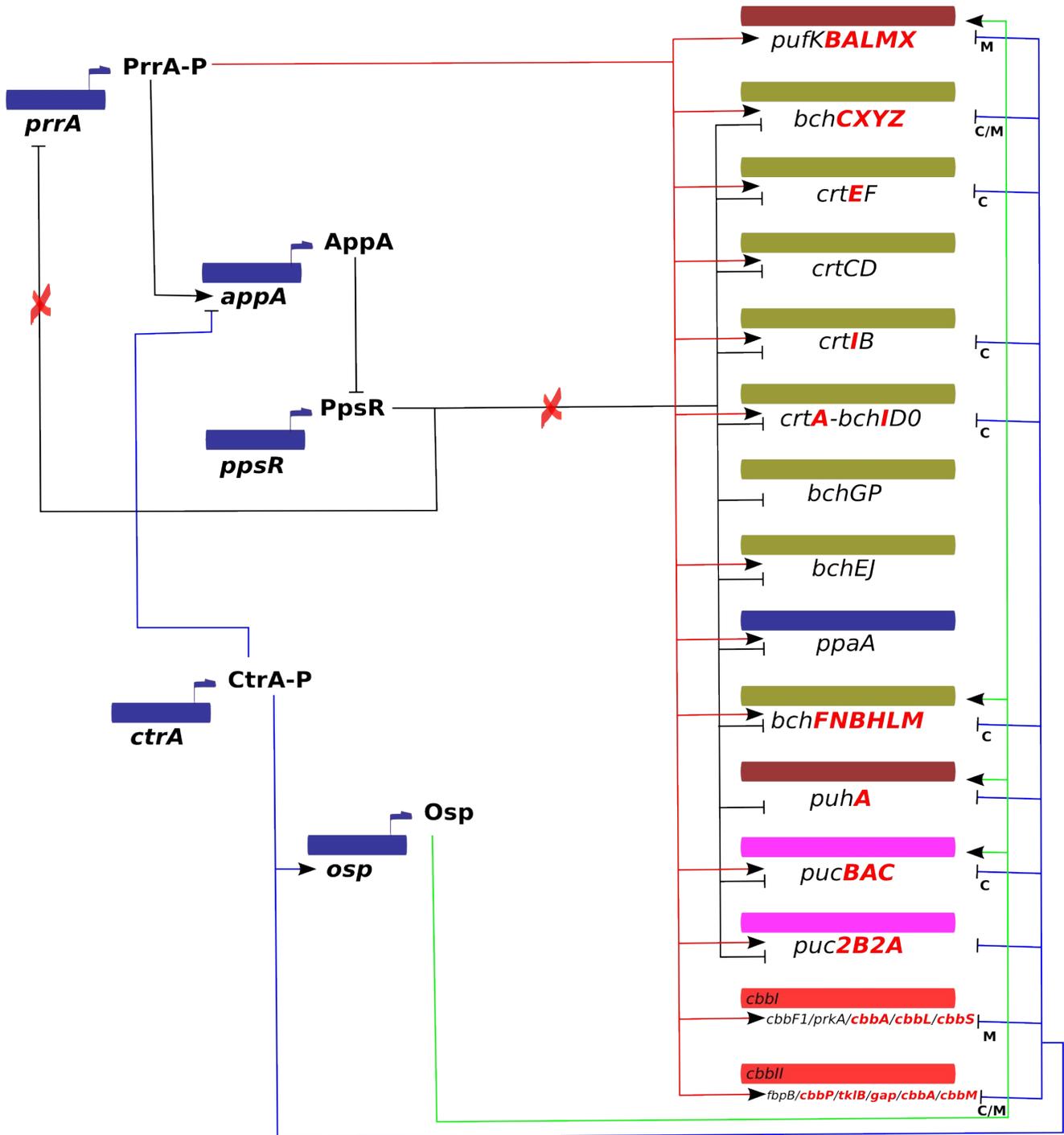


Figura 24. Red parcial de la regulación transcripcional de los genes de fotosíntesis y fijación de carbono en *R. sphaeroides*. Son conjuntados algunos de los resultados reportados por: Imam et al, 2014; Oh et al, 2003; Qian and Tabita, 1996 y los obtenidos en este trabajo. Son señalados los genes de fotosíntesis agrupados en operones, según lo propuesto por Imam et al, 2014. Aquellos genes reportados como regulados negativamente por CtrA según nuestro análisis transcriptómico son señalados en rojo. Es indicada con una C o M la presencia de motivos de unión completos o medios para los genes regulados por CtrA según el análisis *in silico*.

La evaluación del contenido de los complejos B800, B850 y B875 en las cepas AM1, AE1 (AM1 $\Delta ctrA::aadA$) y AM1 pRK415 *ctrA*, permite confirmar los datos transcriptómicos sobre la regulación negativa de CtrA sobre los genes de los complejos antena, ya que el alza en la transcripción de los genes implicados en la síntesis de bacterioclorofila, carotenos y de las proteínas de los complejos antena corresponden a una alza en la producción de los complejos formados por sus productos, por lo que muestran los espectros de absorción. Lo anterior además de verse como una validación de los datos transcriptómicos nos permite decir que CtrA reprime la expresión y formación de los complejos antena en *R. sphaeroides*, lo que también debe ocurrir con las proteínas del centro de reacción.

CtrA promueve la formación de biopelícula

Ha sido previamente mostrado que *R. sphaeroides* es capaz de formar biopelícula en la superficie de cultivos líquidos estáticos y que el sistema flagelar Fla1 es indispensable para su formación (Wilkinson et al, 2011) (Anexo 3). En el presente trabajo se mostró que *R. sphaeroides* es capaz de flotar en un medio completamente líquido (cuando es crecida en SIS con 0.2% de casaminoácidos) al día 3 (Figura 16), mientras que al día 7 en las mismas condiciones es capaz de formar una biopelícula tipo flóculo en el fondo de los viales (Figura 21), siendo ambas respuestas dependientes de CtrA.

Las evidencias que llevan a sugerir que dicha estructura corresponde a una biopelícula son la alta adhesión intercelular, la alta retención de cristal violeta debida a la matriz extracelular producida, la observación de la alta agregación celular y la inmersión de las células dentro de dicha matriz por las observaciones al microscopio confocal.

Dentro de los 321 genes regulados por CtrA que podrían participar en la formación de biofilm destacan los genes flagelares, de pili y 4 diguanilato ciclasas, dos de ellas con actividad de fosfodiesterasa, involucradas en la formación y degradación del segundo mensajero c-di-GMP, que como se mencionó previamente está asociado a la formación de biopelícula, ya sea a nivel transcripcional, postranscripcional, o postraducciona (Ramírez-Mata et al, 2014).

De ser la formación de biopelícula dependiente de c-di-GMPc, varios mecanismos podrían explicar la aparente inactividad de las diguanilato ciclasas al día 3 del experimento. Uno de ellos podría ser un mecanismo postraduccional que impidiera la traducción de los mensajeros de las diguanilato ciclasas, permitiendo su traducción hasta la fase estacionaria de crecimiento; otro podría ser que estuvieran presentes a nivel de proteína y que al menos para aquellas diguanilato con actividad fosfodiesterasa, la actividad fosfodiesterasa se viera favorecida durante las primeras fases del crecimiento (ej. día 3) y que posteriormente la actividad diguanilato ciclasa se viera activada (día 7).

Es además posible que CtrA en una fase estacionaria de crecimiento, como en la que observamos la formación de biopelícula, regule un grupo de genes distinto al regulón observado en este trabajo, ya sea de forma directa o indirecta. El grado de expresión de CtrA en las diferentes fases así como la existencia de reguladores transcripcionales adicionales y reguladores de la actividad de CtrA podrían explicar la posibilidad anterior.

Lo anterior es factible, ya que el análisis transcriptómico del regulón CtrA en *R. capsulatus* en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento, mostró que CtrA presenta regulones variables en ambas fases de crecimiento. Teniendo que en la fase estacionaria CtrA regula exclusivamente un conjunto de 47 genes, teniendo genes implicados en sistemas de transporte, como es el caso de aquellos involucrados en la captura de Fe²⁺, así como los genes del agente de transferencia de genes RcGTA (Mercer et al, 2010).

Pensando en las señales que podrían detonar la formación de biopelícula, se planteó que la presencia de oxígeno durante el crecimiento fotosintético podría ser la señal responsable, por la producción de especies reactivas de oxígeno; sin embargo, su formación se induce tanto en cultivos anaeróbicos y aeróbicos (Figura 21). Entonces se investigó si el aumento en la densidad poblacional de los cultivos al día 7 podría ser el responsable y si la respuesta sensora de quórum estaría involucrada.

La cepa *AM1 ΔcerI* es incapaz de producir el autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecenoil) homoserin lactona,

por lo que se pensaría que las células son incapaces de detectar un aumento en la densidad poblacional mediante su sistema de percepción de quórum. El hecho de que esta cepa presentó una gran afectación en la formación de biofilm sugiere que efectivamente la formación de biofilm depende de un aumento en la densidad poblacional detectado por este sistema, que si bien aún no ha sido caracterizado, debe funcionar de manera similar a los sistemas quórum de otras bacterias, en donde los homólogos de LuxR codificados por *luxR-like* (RSWS8N_05820), *cerR* (RSWS8N_05825) y *qsrR* (RSWS8N_09270) funcionarían como reguladores transcripcionales cuya actividad sería modulada por el autoinductor producido por la sintasa CerI.

Como se mencionó previamente, en *R. capsulatus* CtrA es regulada transcripcionalmente por el sistema de percepción de quórum GtaRI, homólogo al sistema LuxRI de *V. fischeri*. En el sistema GtaRI, el regulador GtaR reprime parcialmente la expresión de CtrA. Es gracias a la interacción del autoinductor (producido por GtaI) con GtaR que se rompe dicha represión, permitiendo una mayor expresión de CtrA en la fase estacionaria de crecimiento y desencadenando la adecuada expresión de los genes del RcGTA (Leung et al, 2013). Posiblemente en *R. sphaeroides* el sistema de percepción de quórum regule de forma similar la actividad transcripcional de CtrA, teniendo que el incremento en la expresión de CtrA hacia la fase estacionaria promovido por el sistema de percepción de quórum sea una de las señales que desencadene la formación de biopelícula.

No debemos olvidar que la disminución en la fuente de carbono (C.A. 0.2%) generada por el consumo del mismo durante 7 días o más, podría ser una señal de estrés, que además del sistema de percepción de quórum, desencadene la formación de biopelícula.

Modelo de la regulación de CtrA en la fisiología de *R. sphaeroides*

Con base en los resultados transcriptómicos y fisiológicos obtenidos en este trabajo, así como por los resultados obtenidos previamente en el laboratorio, podemos proponer el siguiente modelo para la regulación de CtrA en la fisiología de *R. sphaeroides* (Figura 25):

CtrA-OFF

En una condición en la cual CtrA estuviera apagada (estado no fosforilado) o ausente (en ausencia de transcripción o por su degradación) *R. sphaeroides* sería incapaz de ensamblar el flagelo Fla2 o las vesículas de gas, por lo que posiblemente su motilidad dependería del flagelo Fla1 y de su respectivo complejo quimiotáctico. A su vez, el aparato fotosintético y de fijación de carbono no serían reprimidos por CtrA.

CtrA-ON

Una vez activada CtrA por señales ambientales aún desconocidas (con la excepción de una disminución en la concentración de ácidos C4-dicarboxílicos que favorece la transcripción de *cckA* (Vega-Baray et al, 2015), el flagelo Fla2 se expresaría así como su complejo quimiotáctico específico (*cheOp1*, *cheOp2*, *mcpV*, *mcpR*, *mcpJ*, *tlpL*), mientras que el Fla1 se reprimiría transcripcionalmente por acción de CtrA (Elidet Gómez César, datos no publicados). Simultáneamente la expresión de las vesículas de gas se desencadenaría, permitiéndole a *R. sphaeroides* flotar, ocupando niveles superiores en la columna de agua.

La represión de los genes de fotosíntesis y de fijación de carbono, podría interpretarse como una manera de mantener un estado redox equilibrado, considerando una mayor exposición lumínica a la cual se expondría *R. sphaeroides*, aunque habría que tomar en cuenta la regulación dada por el resto de reguladores de fotosíntesis mencionados.

Considerando que la concentración de oxígeno se incrementa conforme se acerca a la superficie y que sigue llevando a cabo fotosíntesis, la respuesta a estrés mediada por RpoH1, GroES, GroEL, UvrB, RecA, RecQ, RadC, RsbV, RsbW, RsiW y GshB podría contender contra el daño oxidativo ocasionado por las especies reactivas de oxígeno generadas en dichas condiciones.

Un incremento en la densidad poblacional detectado por el sistema de percepción de quórum permitiría a *R. sphaeroides* a través de CtrA formar agregados celulares que llevarían finalmente a la formación de biopelícula en el fondo de la columna de agua.

Los estadios de vida sésil y de vida libre en esta bacteria podrían ser cíclicos, permitiéndole a *R. sphaeroides* transitar entre ambos estilos de vida bajo condiciones específicas.

Debemos considerar además, que cuando *R. sphaeroides* expresa el sistema flagelar Fla1 o cuando se expresa el flagelo Fla2, los sistemas quimiotácticos específicos para cada flagelo deben permitirle a esta bacteria dirigirse específicamente hacia ambientes muy particulares, ya sea por la presencia de atrayentes o repelentes.

El ensayo de flotabilidad de la cepa WS8N, así como la inmunodetección de la proteína flagelar FlgE2 (Figuras 17 y 18) indican que bajo ciertas condiciones el sistema CckA/ChpT/CtrA pueda ser activado en la cepa silvestre; sin embargo, aún queda por determinar las señales ambientales involucradas, aunque parece ser que el aumento en la densidad poblacional o algún tipo de estrés generado dentro de los viales en el ensayo de flotabilidad durante 7-10 días puedan ser los responsables.

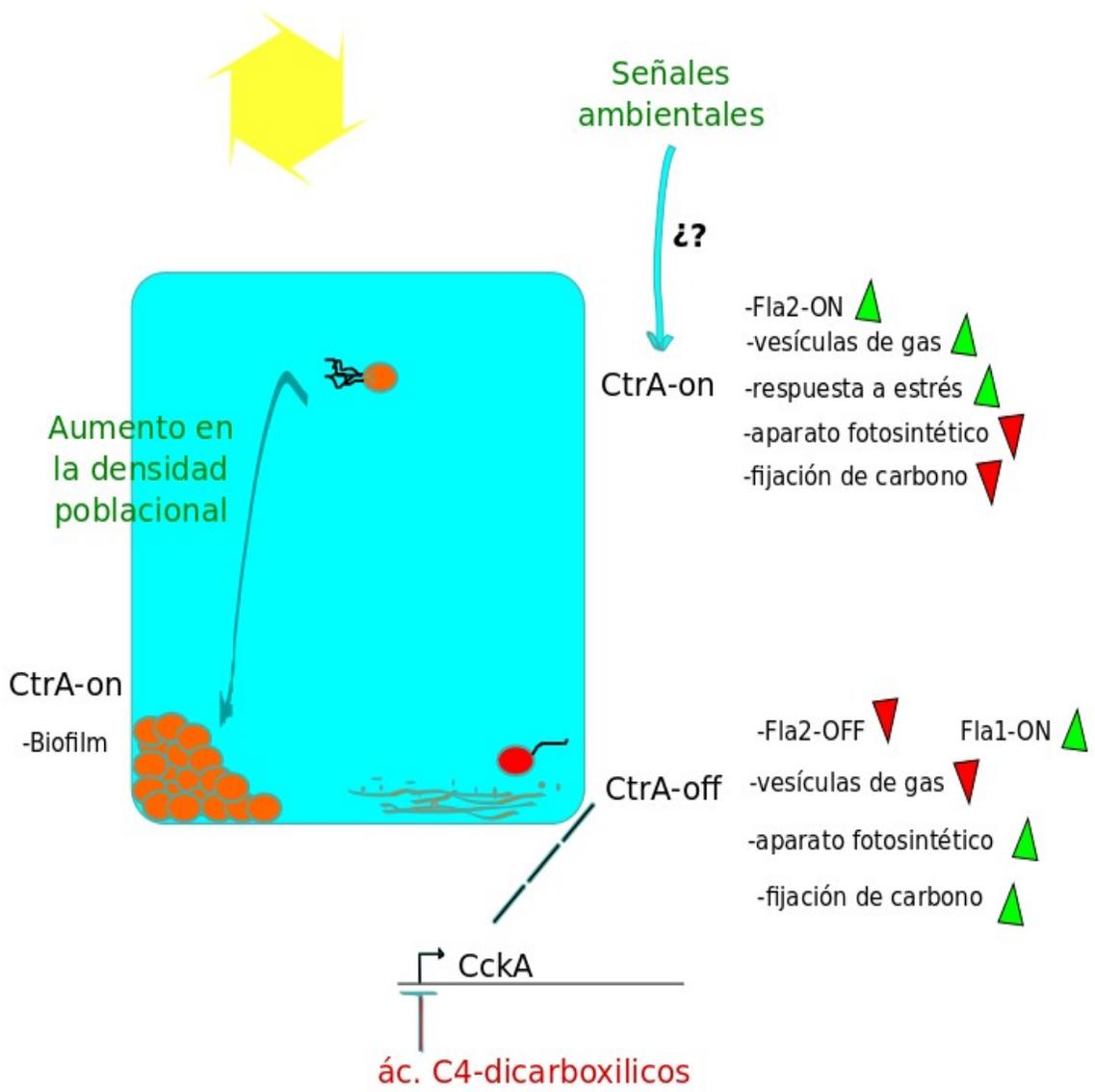


Figura 25. Modelo de la regulación de CtrA en la fisiología de *R.sphaeroides*.

Conclusiones

El regulón CtrA en *R. sphaeroides* está conformado de 321 genes, de los cuales 239 son regulados de forma positiva, mientras que 82 son regulados negativamente.

Al menos 115 genes podrían estar regulados de forma directa, ya sea por cajas completas o medias por CtrA.

Dentro de los grupos de genes regulados por CtrA en esta bacteria están: flagelares *fla2*, quimiotácticos, vesículas de gas, pili tipo Tad/Cpa, agente de transferencia de genes (RsGTA), respuesta a estrés, metabolismo de di-GMPc, transporte y metabolismo de sustratos, reguladores transcripcionales, factores sigma, sistema regulatorio CtrA, fotosíntesis y fijación de carbono.

CtrA regula negativamente la formación de los complejos fotosintéticos antena LHI y LHII.

La expresión de las vesículas de gas a nivel estructural es dependiente de CtrA y dichas estructuras le confieren a *R. sphaeroides* la capacidad de flotar.

Este organismo es capaz de formar un biofilm tipo flóculo en el fondo de los viales, siendo dicha respuesta también dependiente de CtrA y del sistema de percepción de quórum.

Se propone que un aumento en la densidad poblacional es una de las señales que desencadena la activación del sistema CckA/ChpT/CtrA en la cepa silvestre WS8N de *R. sphaeroides*.

Perspectivas

Identificar el regulón directo de CtrA, lo que permitiría validar la propuesta de motivos de unión a CtrA en esta bacteria.

Obtener el perfil transcripcional de la cepa silvestre WS8N crecida en una condición fotoheterotrófica con 100 μM de ácido succínico como fuente de carbono.

Confirmar que el aumento en la densidad poblacional o que algún tipo de estrés desencadenan la activación de CtrA.

Identificar las diferentes señales ambientales que detonan la activación de CtrA.

Evaluar de que forma CtrA regula la formación del biopelícula.

Estudiar de que forma los componentes del sistema de percepción de quórum se comunican con CtrA.

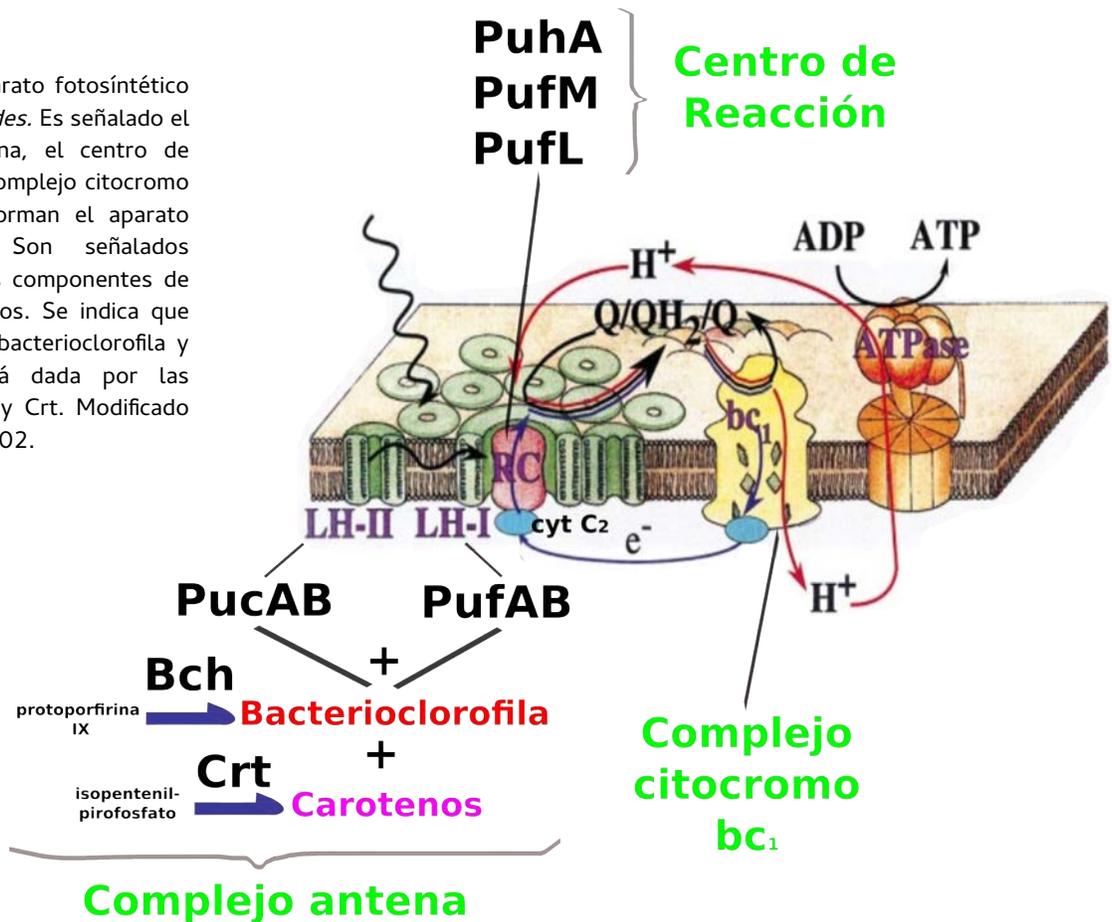
Estudiar cómo cambia la respuesta quimiotáctica de los complejos sensores quimiotácticos cuando CtrA está activa.

Anexos

1. Fotosíntesis en *R. sphaeroides*

Bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, *R. sphaeroides* es capaz de detonar la formación de invaginaciones de membrana intracitoplasmática ("cromatóforos") que albergan a las proteínas y pigmentos necesarios para llevar a cabo las reacciones de fotosíntesis. El aparato fotosintético puede ser dividido en tres complejos: el complejo antena o LH (light harvesting), el centro de reacción (RC) y el complejo citocromo bc1 (Vermeglio and Joliot, 1999) (Figura 26).

Figura 26. Aparato fotosintético de *R. sphaeroides*. Es señalado el complejo antena, el centro de reacción y el complejo citocromo bc1 que conforman el aparato fotosintético. Son señalados algunos de los componentes de dichos complejos. Se indica que la síntesis de bacterioclorofila y carotenos está dada por las proteínas Bch y Crt. Modificado de Hu et al, 2002.



El complejo antena tiene como función el captar la luz incidente y transferir la energía de excitación generada al centro de reacción. *R. sphaeroides* presenta dos complejos antena: LHI (pigmento B875) y LHII (pigmentos B800 y B850). Una subunidad de LHI contiene dos subunidades de las proteínas PufA y PufB, dos moléculas de bacterioclorofila a (bchl) y una o dos moléculas de carotenos. El LHI forma un anillo alrededor del centro de reacción formando el complejo RC-LHI. Un complejo LHI absorbe a alrededor de 875 nm de longitud de onda, por lo que se le conoce como el pigmento B875. Por su parte, el complejo LHII exhibe dos picos de absorción alrededor de 800 nm y 850 nm. El pigmento B800 está formado por dos subunidades de las proteínas PucA y PucB y una molécula de bacterioclorofila, mientras que el pigmento B850 presenta además del par de proteínas Puc, dos moléculas de bacterioclorofila; ambas formas presentan accesoriamente una molécula de caroteno (McEwan, 1994). Las moléculas esferoideno (SE) y su forma oxidada esferoidenona (SO) son los principales carotenos presentes en *R. sphaeroides*. SE es un pigmento de coloración amarilla producido predominantemente en condiciones anaeróbicas de crecimiento. Durante condiciones semi-aeróbicas o aeróbicas, el SE es oxidado enzimáticamente a SO (pigmento rosado) por acción de CrtA; se sabe que el SE predominantemente se asocia al LHII, mientras que SO lo hace con el LHI (Yeliseev et al, 1996).

La síntesis de carotenos en *R. sphaeroides* requiere de 7 genes: *crtA*, *crtI*, *crtB*, *crtC*, *crtD*, *crtE* y *crtF*. Es a partir del precursor isopentenil-pirofosfato que se pueden generar los carotenos hidroxiesferoidenona y esferoidenona, productos finales de dos vías biosintéticas que comparten algunos pasos catalíticos (Naylor et al, 1999).

Para la síntesis de bacterioclorofila han sido descritos 16 genes en *R. sphaeroides*: *bchM*, *bchL*, *bchH*, *bchB*, *bchN*, *bchF*, *bchE*, *bchJ*, *bchG*, *bchP*, *bchD*, *bchl*, *bchC*, *bchX*, *bchY* y *bchZ*. Las enzimas anteriores son capaces de transformar al precursor protoporfirina IX a bacterioclorofila a (Naylor et al, 1999).

Accesorio a la presencia del operón *pucBAC* que codifica a las proteínas PucA y PucB del complejo antena LHII, existe en el genoma de *R. sphaeroides* el operón *puc2BA*. La proteína PucB2 codificada

por dicho operón presenta un 94% de identidad con su respectivo parólogo. Sin embargo, la proteína PucA2 se predice ser 263 a.a. más larga que su parólogo PucA1 de 54 a.a. A pesar de que dicho operón se expresa, sólo la proteína PucB2 es capaz de formar parte del complejo LHII, pero únicamente en presencia de PucB1. La versión completa de PucA2 o una versión trunca conteniendo sólo los 48 a.a. del extremo N terminal no es capaz de formar parte de su respectivo complejo antena (Zeng et al, 2003).

La función del RC es la de recibir la energía de excitación del complejo antena e iniciar la separación de cargas. El RC de *R. sphaeroides* está compuesto de tres subunidades PuhA (subunidad H), PufM y PufL. Las proteínas integrales de membrana PufL y PufM interactúan con cuatro moléculas de bacterioclorofila, dos bacteriofeofitinas, dos quinonas y un átomo de Fe. Una vez que un fotón es captado por el complejo antena, la energía de excitación es transferida al RC. En el RC un electrón es transferido de un donador primario excitado, un dímero de bacterioclorofila, a una molécula de bacteriofeofitina y subsecuentemente a la quinona primaria (QA). El electrón es transferido de la QA reducida a la quinona QB asociada al RC, la cual posteriormente es reducida por segunda vez por el mismo sistema. Posteriormente, la QB toma dos protones del espacio citoplasmático y es liberada del RC. El quinol generado (QH₂) es oxidado por cyt C2, siendo dicha reacción catalizada por el complejo citocromo bc1, el cual libera los dos protones al espacio periplásmico. El donador primario foto-oxidado es reducido por la proteína periplásmica cyt c2, lo que completa la transferencia cíclica de electrones (Vermeaglio and Joliot, 1999) (Figura 26).

Se conoce que la expresión de los genes de fotosíntesis en *R. sphaeroides* está mediada principalmente por la disponibilidad de oxígeno y luz, ésto mediante los sistemas regulatorios AppA/PpsR y PrrB/PrrA (Jäger et al, 2007).

PpsR es un represor transcripcional de los genes de fotosíntesis *bch*, *crt*, *puc*, *puf* y *puhA*, es decir, regula la biosíntesis de bacterioclorofila, carotenos, complejos antena LHI y LHII y el centro de reacción

(Moskvin et al, 2005). En respuesta a una reducida concentración de oxígeno, AppA es capaz de interactuar y antagonizar a PpsR, en cambio, a concentraciones intermedias de oxígeno, la absorción de luz azul por AppA mediante su dominio BLUF resulta en la disociación del complejo AppA/PpsR, lo que lleva a la represión de sus genes blanco (Jäger et al, 2007).

Así mismo, en ausencia o a bajas concentraciones de oxígeno, la cinasa de histidina PrrB se autofosforila, transfiriendo el grupo fosforilo a su regulador de respuesta PrrA. PrrA fosforilado es capaz de unirse al DNA y desencadenar la expresión de los genes de fotosíntesis *bch*, *crt*, *puc*, *puf* y *puhA* (Imam et al, 2014). El sistema PrrB/PrrA es también capaz de activar la expresión de los operones *cbbI* y *cbbII* (Qian and Tabita, 1996), que contienen a los genes del ciclo de Calvin, para la fijación de CO₂, como es el caso de los genes de las rubisco (rubisco I: *cbbL* y *cbbS*; rubisco II: *cbbM*) (Uchino and Yokota, 2003). En presencia de oxígeno, el flujo de electrones hacia la citocromo oxidasa Cbb3 transmite una señal a PrrB, inhibiendo su fosforilación (Imam et al, 2014).

PrrA es capaz de regular la transcripción de *appA* de forma positiva, mientras que PpsR puede regular negativamente la transcripción de *prpA*, lo que permite que ambas vías de regulación de los genes fotosintéticos puedan conectarse, permitiendo una robusta regulación de su expresión (Imam et al, 2014).

Osp es otro regulador positivo de fotosíntesis, que regula la transcripción de los genes *puc*, *puf*, *puhA*, *bchC* y *bchF*. A pesar de que Osp parece ser un regulador de respuesta, estudios de mutagénesis dirigida muestran que Osp parece no ser parte de una vía de transducción de señales que implique fosforilación. Se sugiere además que la regulación de Osp sobre sus genes blanco sea indirecta, ya que es incapaz de asociarse a las regiones promotoras de sus genes blanco (Oh et al, 2003).

2. Vesículas de gas y flotabilidad

Las vesículas de gas (VG) son estructuras proteicas huecas rellenas de gas, de localización citoplásmica, que le confieren flotabilidad a las bacterias en medios acuosos, permitiéndoles posicionarse preferentemente en diferentes niveles de la columna de agua (Pfeifer, 2012). La flotabilidad dada por éstas estructuras ha sido documentada en bacterias como *Serratia sp.* ATCC 39006 (Tashiro et al, 2016) y *Microcystis sp.* FACHB 930 (Gao et al, 2016) y en arqueas como *Halobacterium salinarium* (Stoeckenius and Kunau, 1968) (Figuras 27 y 28). Se ha propuesto que las VG pueden también estar implicadas en procesos celulares como la resistencia a estrés osmótico y la esporulación en especies no acuáticas como *Streptomyces coelicolor* (Lee et al, 2005) y *Bacillus megaterium* (Li and Cannon, 1998) respectivamente.

La pared de las VG está conformada de una monocapa peptídica de la proteína GvpA, tanto en bacterias como en arqueas (Figura 27). En cianobacterias y arqueas ha sido descrita otra proteína estructural, GvpC, que se localiza en la superficie de dichas estructuras, confiriendo una mayor estabilidad (Pfeifer, 2012). A su vez, se propone que la proteína GvpF en *Microcystis aeruginosa* es una proteína estructural accesoria, que recubre a las VG (Xu et al, 2014).

Se conoce que la proteína GvpA presenta dos láminas beta flanqueadas por dos hélices alfa, mediante las cuales los monómeros de GvpA son capaces de interactuar de forma antiparalela. La unión de múltiples monómeros de GvpA forman costillas, visibles mediante la observación de las VG por microscopía electrónica. Es entonces el número de costillas lo que determina la longitud de las VG. Las láminas beta de GvpA tienen un carácter altamente hidrofóbico que al orientarse hacia la cara interna de la VG generan una superficie hidrofóbica que minimiza la nucleación de moléculas de agua dentro de las VG, permitiéndoles llenarse de aire (Walsby 1994; Knitsch et al, 2017).

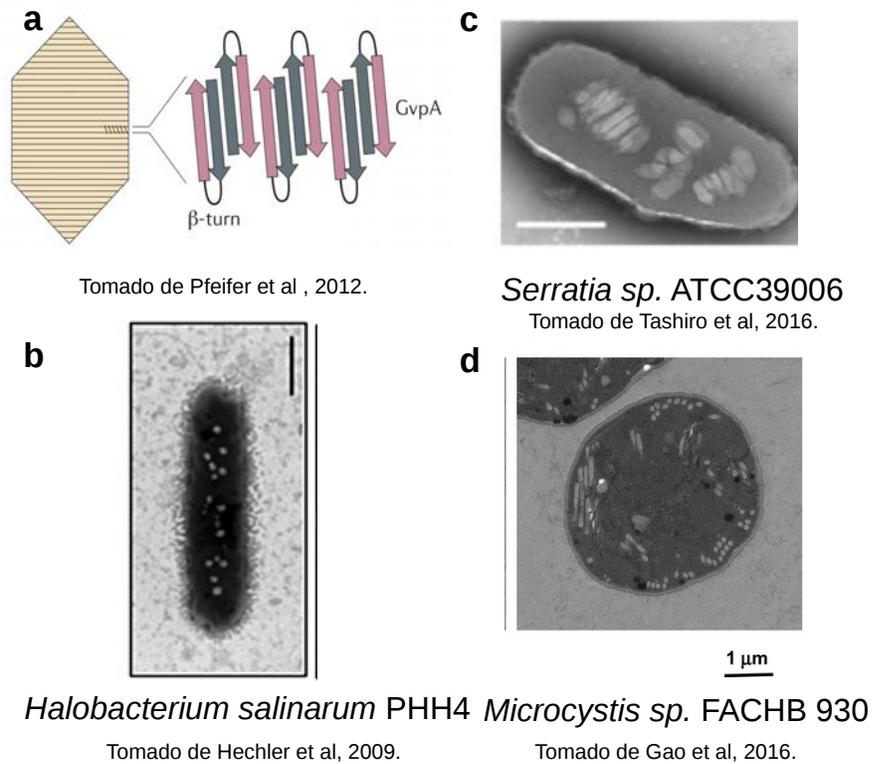


Figura 27. Vesículas de gas en diferentes bacterias y arqueas. (a) Modelo de la proteína estructural GvpA formando parte de una vesícula de gas. (b-d) Micrografías electrónicas de la arquea *H. Salinarium* PHH4 y de las bacterias *Serratia sp.* ATCC39006 y *Microcystis sp.* FACHB 930 conteniendo vesículas de gas.

En *H. Salinarium*, se presume que las proteína GvpS, GvpJ y GvpM tengan algún rol estructural, dada su alta similitud con la proteína GvpA (Offner et al, 2000).

Para el caso de la proteína GvpN se sabe que en su ausencia hay una reducción en el tamaño de las VG, en *H. salinarium* (Pfeifer 2015) y en *Serratia sp.* ATCC 39006 (Tashiro et al, 2016), y dada la presencia de un dominio ATPasa en la proteína se sugiere que ésta cumple una función de chaperona en el ensamblaje de las VG.

La presencia de dominios de hélices superenrolladas en las proteínas GvpF y GvpL hace pensar que

puedan estar involucradas en la nucleación de las VG, ya que dichos dominios se han visto involucrados en la oligomerización de proteínas (Shukla and DasSarma, 2004).

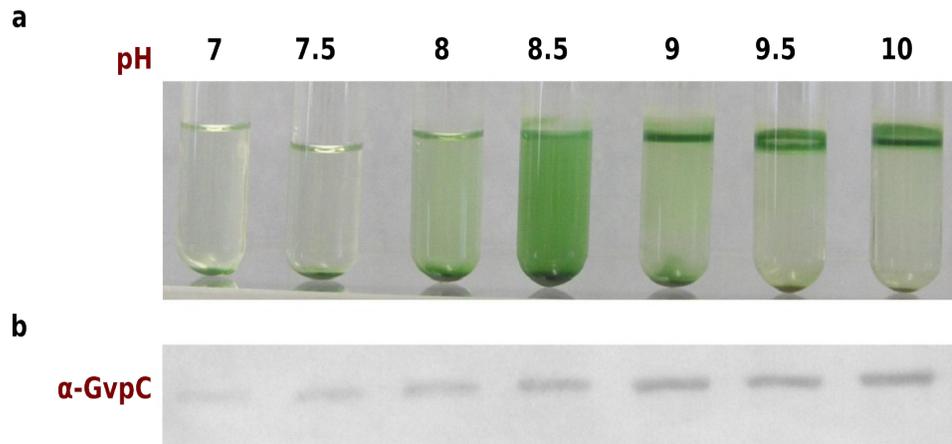


Figura 28. La expresión de las vesículas de gas y la flotabilidad son dependientes del pH en la cianobacteria *Microcystis sp.* FACHB 930. (a) Ensayo de flotabilidad en medio de cultivo líquido adicionado con buffer TES a diferentes pH (7-10). (b) La expresión de la proteína estructural de vesículas de gas GvpC varía en función al pH del medio. A pH 10 se alcanza la mayor expresión de GvpC y el mayor grado de flotabilidad (Gao et al, 2016).

Tres grupos de reguladores transcripcionales de las VG han sido descritos. En el caso de *H. salinarium* la proteína GvpD funciona como un activador transcripcional, mientras que GvpE inhibe la actividad de GvpD (Hofacker et al, 2004). Para el caso de *Serratia sp.* ATCC 39006, las proteínas GvrABC son requeridas para la completa transcripción del gen estructural *gvpA1*, por lo que sugiere que tengan un rol de reguladores transcripcionales (Tashiro et al, 2016). A su vez, el análisis transcriptómico que llevó a la determinación del regulón CtrA en *R. capsulatus* demostró que CtrA regula de forma positiva la transcripción de los genes de vesículas de gas en esta bacteria (Mercer et al, 2010); sin embargo, no existen análisis posteriores, que permitan definir su presencia a nivel estructural o su rol en la fisiología de este organismo.

Aún no es claro el papel de algunas proteínas esenciales para la formación de las VG como GvpO,

GvpK y GvpG en *H. salinarium* y *Serratia sp.* ATCC 39006 (Offner et al, 2000; Tashiro et al, 2016), o de GvpH, que parece ser parcialmente relevante en *H. salinarium* (Dassarma et al, 1994).

R. sphaeroides presenta 13 homólogos de genes de VG (Figura 29) agrupados en un cluster de 8,147 pb. Los genes *gvpN*, RSWS8N_19454, *gvpO*, *gvpA2*, *gvpH*, *gvpL/F*, *gvpG*, *gvpL/F*, *gvpL/F*, *gvpS*, *gvpL/F* y *gvpK* se transcriben en la misma dirección, lo que podría implicar que son parte de un operón. El gen *gvpA1* se encuentra separado del resto de los genes por el gen *hutH* y dado que su transcripción se da en el sentido opuesto al posible operón puede asumirse que es un locus independiente.

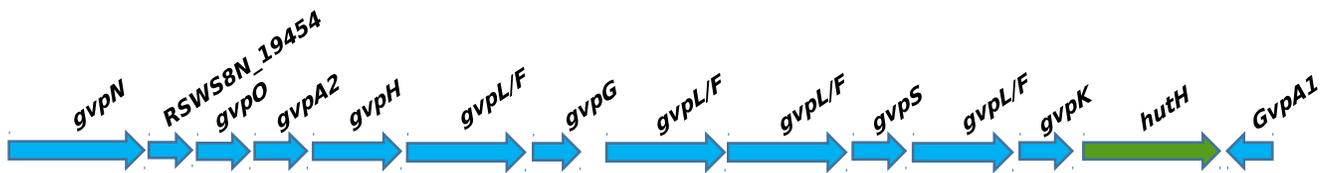


Figura 29. Cluster de genes de Vesículas de Gas de *R. sphaeroides*, que contiene 12 homólogos de genes de VG, el marco de lectura RSWS8N_19454 y al gen *hutH*. Se señala el sentido de la transcripción de dichos genes. Su tamaño en la figura es proporcional a su tamaño en pb.

En la familia Rhodobacteraceae hasta el momento sólo se ha descrito la presencia de VG en *Octadecabacter articus* y *Octadecabacter antarticus* (Gosink et al, 1997).

3. Biofilm y respuesta sensora de quórum

El biofilm puede ser definido como agregados de microorganismos de una sola especie o multiespecie embebidos en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (polisacáridos, proteínas, lípidos y DNA extracelular) producida por ellos mismos. Dichos agregados celulares pueden estar adheridos a un sustrato o no (flóculos), así mismo, pueden estar altamente estructurados, existiendo por ejemplo

canales internos, que facilitan el acceso de O₂ y nutrientes, así como la remoción de productos de desecho (Flemming et al, 2016; Kievit, 2009).

El estar formando un biofilm le confiere a estos organismos propiedades inexistentes en un estado de vida libre, dadas principalmente por la formación de la matriz extracelular como lo son hidratación, captura de recursos por absorción, retención de enzimas que les confieren capacidades digestivas extracelulares, protección de agentes antimicrobianos, además de facilitar las interacciones intercelulares que pueden incrementar las capacidades metabólicas y la transferencia horizontal de genes (Flemming et al, 2016).

Se ha descrito que el aumento en la densidad poblacional sentido por un sistema de quórum (QS) puede detonar la formación de biofilm en bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* (Li and Tian, 2012).

El QS es un sistema que le permite a las bacterias sensor la densidad poblacional y detonar la expresión de determinados genes cuando el número de células es elevado. En *Vibrio fischeri* la proteína LuxI cataliza la formación de una molécula llamada autoinductor (un tipo de homoseril lactona) que es producida y expulsada al medio continuamente. Una vez alcanzada una elevada densidad poblacional, la concentración del autoinductor es tal que permite su asociación al regulador transcripcional LuxR activando la expresión de los genes de luminiscencia (Puskas et al, 1997).

En *P. aeruginosa* es sabido que el sistema de QS controla la producción de ramnolípidos (glucolípidos anfipáticos que pueden ser usados como surfactantes) que se han visto involucrados en la formación de microcolonias durante la formación del biofilm, en el mantener los canales internos abiertos y en el desprendimiento de las células de dichas estructuras. El sistema QS se ha visto además involucrado en la correcta expresión de los genes biosintéticos de exopolisacáridos *pel* y en el presentar adecuados niveles de DNA extracelular, ambos componentes esenciales en la formación del biofilm (de Kievit,

2009).

En la α -proteobacteria *R. capsulatus*, CtrA es regulada transcripcionalmente por el sistema de QS GtaRI, homólogo al sistema LuxRI de *V. fischeri*. En el sistema GtaRI el regulador GtaR regula negativamente la expresión de CtrA. Se propone que la interacción del autoinductor producido por GtaI con GtaR rompa dicha represión, permitiendo una mayor expresión de CtrA en la fase estacionaria de crecimiento. Lo anterior permite la adecuada expresión de los genes del RcGTA (Leung et al, 2013).

A su vez, *S. melonis* es capaz de formar biopelículas, ya que CtrA regula la expresión de genes implicados en la síntesis de exopolisacáridos y en la señalización por c-di-GMP (Frances-Charlot et al, 2015).

Ahondando en lo anterior, ha sido descrita una relación estrecha entre el ácido di-(3' 5') guanosín-monofosfato ó c-di-GMP y la formación de biofilm. El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP (guanosín trifosfato) por acción de un grupo de enzimas llamadas diguanilato ciclasas, mientras que su degradación a GMP se lleva a cabo por las fosfodiesterasas. Este segundo mensajero celular regula la formación del biofilm a diferentes niveles: expresión de genes que codifican a componentes de la matriz extracelular, como exopolisacáridos, adhesinas y proteínas de membrana, muerte celular y dispersión. Lo anterior puede ocurrir a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional. Se sabe que diferentes reguladores transcripcionales son capaces de interactuar directamente con el c-di-GMP, modulando la expresión de genes de biofilm como los de las fimbrias. A su vez, las regiones 5' UTR de algunos RNA mensajeros pueden asociarse a estas moléculas, modulando la traducción de los mensajeros de diguanilato ciclasas o fosfodiesterasas. Ha sido descrita también una regulación alostérica de las enzimas involucradas en la producción de exopolisacáridos celulosa y alginato, así como el papel estabilizador del c-di-GMP en la interacción proteína-proteína en la secreción de EPS y en la estabilización de adhesinas en la membrana (Ramírez-Mata et al, 2014).

Fue reportado que *R. sphaeroides* es capaz de formar biofilm en la superficie de cultivos líquidos

estáticos y que la presencia del flagelo Fla1 es requerida para su formación, ya que cepas mutantes en *fliA* o *flgM* (cepas Fla1- o no nadadoras) fueron incapaces de formar un biofilm como la cepa silvestre (Wilkinson et al, 2011) (Figura 30).

Se ha descrito que *R. sphaeroides* presenta un sistema de sensado de quórum en el cual la proteína CerI (ortólogo de LuxI) produce el autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecenoil) homoserin lactona (Figura 31). Cuando es crecida aeróbicamente en medio líquido la mutante en *cerI* presenta una alta agregación celular y la formación de flóculos que se precipitan al fondo del tubo de cultivo. Dicha agregación se puede resolver añadiendo autoinductor o expresando al gen *cerI* en trans. Se sugiere que dicho fenómeno puede deberse a una sobreproducción de polisacáridos extracelulares en la ausencia de CerI (Puskas et al, 1997).

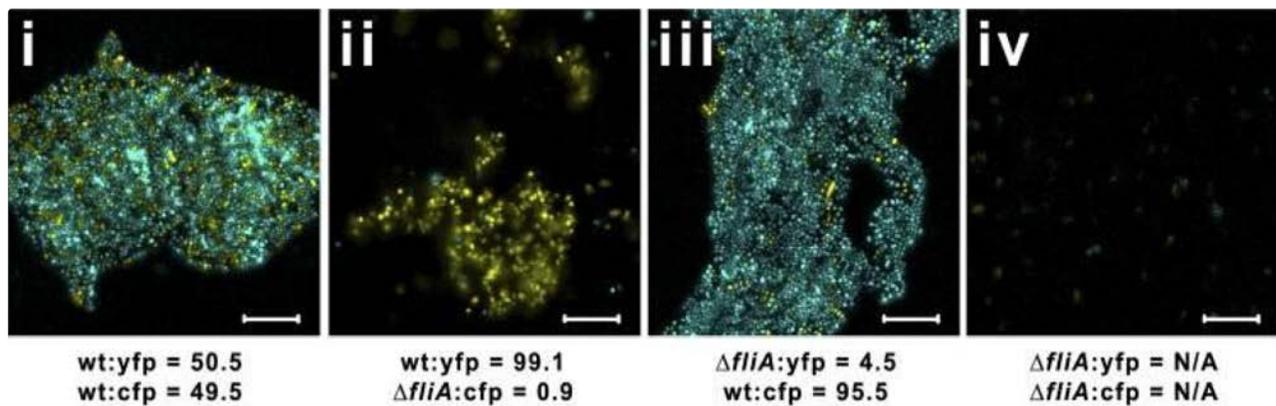


Figura 30. Formación de biofilm en *R. sphaeroides*. Micrografías de fluorescencia de cepas de *R. sphaeroides* expresando las proteínas YFP o CFP. La cepa silvestre (wt) es capaz de formar biofilm (i), aún en presencia de la cepa no mótil $\Delta fliA$ (ii y iii), en cambio, la cepa $\Delta fliA$ por sí misma es deficiente en su formación (iv) (Wilkinson et al, 2011).

En *R. Sphaeroides*, el gen *cerI* se localiza en un posible operón con los genes homólogos de LuxR: RSWS8N_05820 y *cerR* y con el gen de función desconocida *cerA* (Figura 31), los cuales aún no han

sido caracterizados en esta bacteria. Existe además otro posible homólogo de LuxR en *R. sphaeroides* denominado *qsrR*, el cual mediante proteómica ha mostrado regular la expresión de 12 proteínas, entre las cuales destacan CheW1, CheB1, PufL, CbbX, PrrA y PrrB (Won et al, 2008).

Pese a lo anterior, hasta el momento no se ha observado la existencia de un vínculo entre la formación de biofilm y c-di-GMP y de biofilm con QS en *R. sphaeroides* y si acaso CtrA pudiera ser el vínculo de dichos procesos.

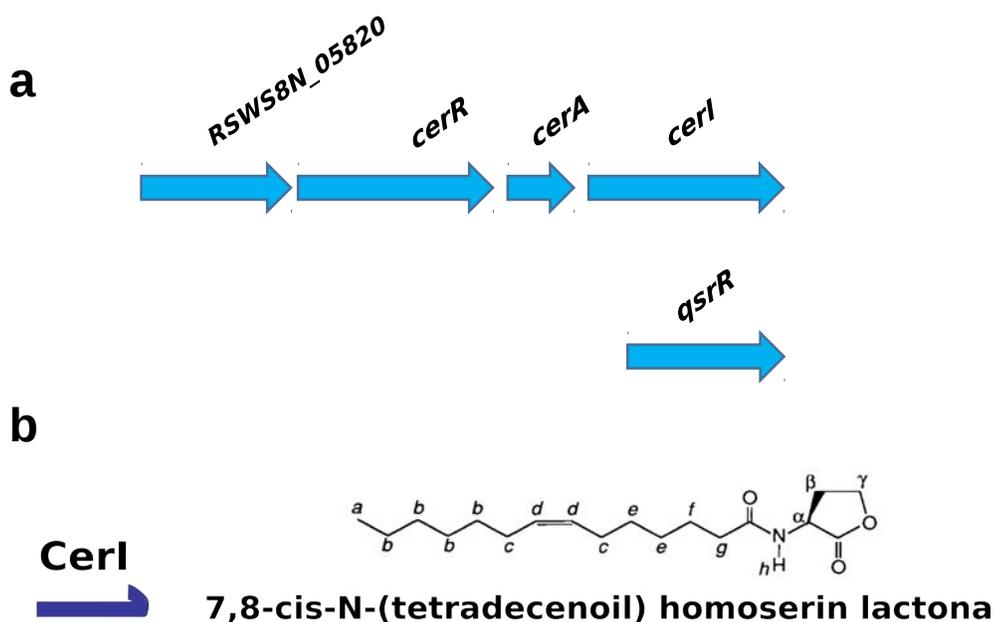


Figura 31. Sistema sensor de quorum en *R. sphaeroides*. (a) Organización de los genes de quorum-sensing en *R. sphaeroides*. Los genes *luxR-like* (RSWS8N_05820), *cerR* (RSWS8N_05825), *cerA* (no anotado en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N), *cerI* (RSWS8N_05830) se encuentran organizados en un posible operón. El gen *qsrR* se localiza independientemente. (b) La proteína CerI produce el autoinductor 7,8-cis-N-(tetradecenoil) homoserin lactona (Puskas et al, 1997).

4. Colocalización de vesículas de gas con el flagelo Fla2

Se ha observado mediante MET que las vesículas de gas normalmente están localizadas en el polo

flagelado de la célula (Figura 13), aspecto que no ha sido previamente descrito para ninguna otra bacteria. Para evaluar la reproducibilidad de dicha observación se llevó a cabo la inmunodetección del gancho del flagelo Fla2 (FlgE2) simultáneamente con la tinción de la proteína fusión GvpA-Tcys que permite detectar vesículas de gas fluorescentes y de ésta forma poder visualizar a ambas estructuras en la cepa AM1 *gvpA-Tcys*. La tinción del gancho se llevó a cabo con Zenon Alexa Fluor 546, mientras que para las vesículas de gas se hizo con FIAsh-EDT2. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia.

Pudimos observar que en el 98% de las células observadas hay una colocalización de las vesículas de gas con el flagelo (Figura 32); sin embargo, aún queda por explorar el mecanismo molecular de dicho fenómeno y si tuviera algún rol en la fisiología de esta bacteria.

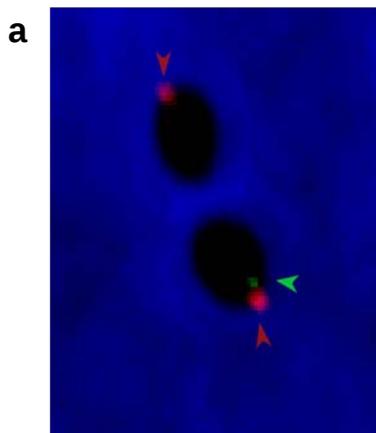
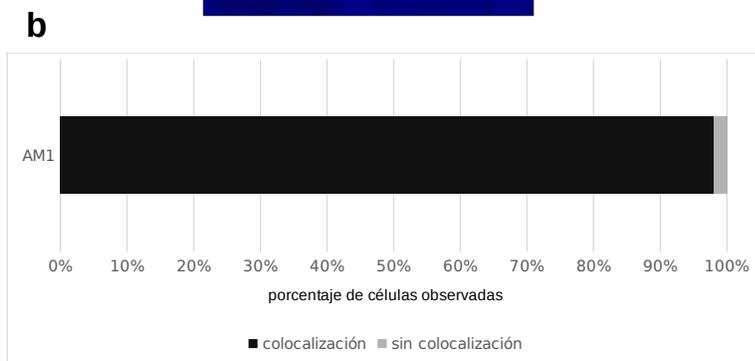


Figura 32. Colocalización de GvpA-Tcys y FlgE2. (a) Microscopías de fluorescencia mostrando la localización celular de GvpA-Tcys (puntos de fluorescencia verdes) y de FlgE2 (puntos de fluorescencia rojos) en la cepa AM1 *gvpA-Tcys*. (b) El porcentaje de células con vesículas de gas y ganchos colocalizados es mostrada. Al menos 100 células fueron cuantificadas.



5. Observación de las VG en la cepa AM1 crecida en ensayo de flotabilidad

Consistente con la idea de que la población de células en la superficie del cultivo de la cepa AM1 en el ensayo de flotabilidad presenta vesículas de gas, su presencia se confirmó mediante MET. Para ello la cepa se creció como se indica en el apartado "Ensayo de flotabilidad" de Materiales y Métodos durante 10 días. Entonces se tomó 0.5 ml de la superficie del cultivo para ser lavado con la finalidad de remover el agar del medio; posteriormente se preparó una rejilla para el MET como se indica en el apartado "Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)" de Materiales y Métodos para finalmente ser observada (Figura 33).

Es evidente la presencia de las VG en la cepa AM1 al día 10, lo que confirma la propuesta de que el fenotipo observado si es debido a la flotabilidad conferida por las vesículas de gas.

Además, salta a la vista el considerable incremento en el tamaño de dichas estructuras, ya que mientras las vesículas de gas observadas en AM1 en la condición de crecimiento fotoheterotrófica anaeróbica con 100 μM de ácido Succínico durante 16 h presentan una longitud de ~ 100 nm, su longitud en el ensayo de flotabilidad al día 10 se incrementa hasta ~ 600 nm.

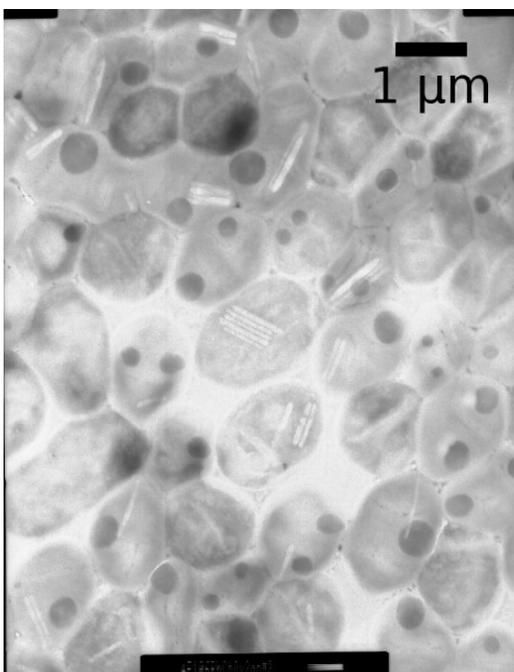


Figura 33. Micrografía electrónica de la cepa AM1 crecida en viales con 0.15% de agar y 0.2% de C.A. en presencia de luz durante 10 días. Las células fueron tomadas de la superficie del vial.

6. Espectros de absorción de pigmentos fotosintéticos de las cepas AM1 y AM1 pRK415

Se demostró que la cepa AM1 pRK415 *ctrA* wt, que expresa a *ctrA* desde el plásmido pRK415 además de la copia del cromosoma, presenta una clara disminución en la producción de los pigmentos B800, B850 Y B875 lo que puede deberse a que un incremento de CtrA en la célula que conduce a una mayor represión de los genes fotosintéticos implicados en la biosíntesis de los pigmentos. La cepa AM1 pRK415 mostró el mismo comportamiento que la cepa AM1, lo cual implica que la disminución en la producción de los pigmentos fotosintéticos evaluados es debida a las copia extra de *ctrA* expresandose en trans y no a la presencia del plásmido PRK415 (Figura 34).

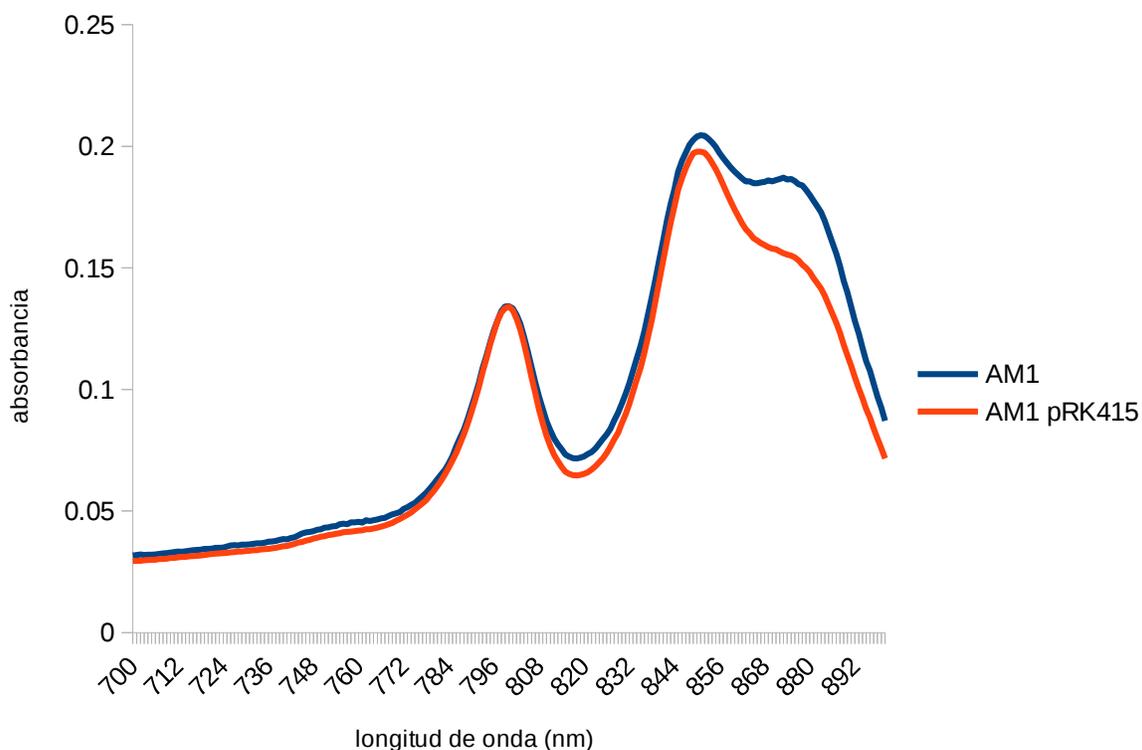


Figura 34 . Espectros de absorción de 700 a 900 nm de extractos totales de cepas crecidas en medio SIS 100uM de succínico en presencia de luz durante 48 h.

7. Resultados del análisis de expresión diferencial

old ID	new ID	log2foldchange	padj	name	COG	FPKM	
						AM1	CtrA
RSWS8N_00215	RSWS8N_RS00215	-4.4339178391	2.73E-053 #		R	303.745	12.964
RSWS8N_00565	RSWS8N_RS00560	-2.7187331866	9.56E-011 #		L	17.5327	2.2076
RSWS8N_00655	RSWS8N_RS00655	-2.7702093735	1.64E-018 #		C	1829.89	254.52
RSWS8N_00660	RSWS8N_RS00660	2.3858538171	1.01E-009	uvrB	L	16.1992	91.381
RSWS8N_00665	RSWS8N_RS00665	-2.9804406635	1.52E-010 #		P	1252.99	137.98
RSWS8N_00680	RSWS8N_RS00680	-3.9055473808	2.44E-012 #		S	10505.6	529.97
RSWS8N_01110	RSWS8N_RS01115	2.709400183	9.22E-018	gabT	E	13.0222	90.544
RSWS8N_01115	RSWS8N_RS01120	-7.4609914543	3.71E-071	dprA	L	1744.64	7.3068
RSWS8N_01355	RSWS8N_RS01350	-3.967065817	5.92E-021	mssB	M	592.767	32.208
RSWS8N_01360	RSWS8N_RS01355	-3.937413808	1.42E-012	fliG2	N	3063.35	150.85
RSWS8N_01390	RSWS8N_RS01380	2.1426744464	0.0060288 #		J	98.2691	561.19
RSWS8N_01610	RSWS8N_RS01600	2.2456315134	0.0014865 #		R	78.3355	463.59
RSWS8N_01655	RSWS8N_RS01645	-2.2422791934	5.02E-008	livM3	E	248.781	48.549
RSWS8N_01660	RSWS8N_RS01650	-2.1871830257	1.20E-005 #		E	258.543	50.926
RSWS8N_01665	RSWS8N_RS01655	-2.437697811	2.75E-005 #		E	221.861	34.428
RSWS8N_01670	RSWS8N_RS01660	-2.7154250943	2.84E-010	fadD3	I	373.687	51.291
RSWS8N_01835	RSWS8N_RS01815	-3.7456101249	8.54E-010	groES	O	886.82	47.559
RSWS8N_01840	RSWS8N_RS01820	-3.6712595203	4.96E-009	groEL	O	833.041	46.34
RSWS8N_01905	RSWS8N_RS01885	-2.6333829195	4.46E-013 #		K	257.462	38.883
RSWS8N_02190	RSWS8N_RS02170	2.6868445532	0.0002739	bsaA	O	122.103	1085.3
RSWS8N_02290	RSWS8N_RS02270	-3.7659328903	3.29E-018	rpoHI	K	5620.59	353.86
RSWS8N_02395	RSWS8N_RS02370	-4.1211632909	5.83E-019	omp	S	1274.92	59.696
RSWS8N_02400	RSWS8N_RS02375	-4.2253711893	1.38E-022	metY	E	4033.58	180.51
RSWS8N_02405	RSWS8N_RS02380	-7.3434214433	5.14E-075 #		-	10477.1	49.44
RSWS8N_02410	RSWS8N_RS02385	-5.9027612665	2.54E-020	cheY2	T	18873	163.68
RSWS8N_02415	RSWS8N_RS02390	-4.0807899915	3.46E-011	cheR1	O	3595.31	146.08
RSWS8N_02420	RSWS8N_RS02395	-3.0716230882	1.72E-006	cheW1	T	1682.96	151.18
RSWS8N_02425	RSWS8N_RS02400	-6.306309398	7.84E-037	cheA1	T	2788.13	24.097
RSWS8N_02430	RSWS8N_RS02405	-8.1051077554	9.99E-078	cheY1	T	4631.14	11.694
RSWS8N_02435	RSWS8N_RS02410	-7.6575131218	1.16E-041	cheX	T	5407.23	14.529
RSWS8N_02440	RSWS8N_RS02415	-7.0423803644	7.21E-035	cheD	T	3462.54	14.831
RSWS8N_02445	RSWS8N_RS02420	-7.1797567556	5.90E-035	mcpA	T	4271.87	15.451
RSWS8N_02450	RSWS8N_RS02425	-6.9337039248	3.59E-080	tlpS	T	1268.71	8.3694
RSWS8N_02455	RSWS8N_RS02430	-7.7661971899	1.41E-079	mcpB	T	1937.04	6.4767
RSWS8N_02460	RSWS8N_RS02435	-7.0691970188	9.90E-070	cheY5	T	2672.03	14.74
RSWS8N_02465	RSWS8N_RS02440	-7.4494432589	3.06E-064 #		O	2805.13	10.723
RSWS8N_02565	RSWS8N_RS02540	-3.1463420837	1.33E-014 #		S	52.8043	5.9766
RSWS8N_02570	RSWS8N_RS02545	-3.2643803202	1.45E-028	termina	X	22.8642	2.3332
RSWS8N_02575	RSWS8N_RS02550	-2.5252036163	7.64E-015	portal	O	10.8404	1.9112
RSWS8N_02580	RSWS8N_RS02555	-2.4182033886	2.12E-006 #		S	15.7999	3.7842
RSWS8N_03105	RSWS8N_RS03070	2.2888818411	9.46E-006 #		G	598.446	3298.6
RSWS8N_03315	RSWS8N_RS03285	-3.1961974462	7.18E-009	sciP	S	460.833	41.477
RSWS8N_03400	RSWS8N_RS03365	-2.4731258962	6.59E-007 #		P	302.19	48.237
RSWS8N_03435	RSWS8N_RS03400	-2.4541932158	2.97E-006	eda	G	638.672	101.12
RSWS8N_03930	RSWS8N_RS03875	3.0446643329	2.40E-011 #		G	204.947	1935.3
	RSWS8N_RS04395	-2.3590362631	1.51E-008 #		S	72.6672	12.669
RSWS8N_04455	RSWS8N_RS04405	-2.4928444785	1.33E-010 #		H	330.503	54.398

RSWS8N_04530	RSWS8N_RS04485	2.8257748862	7.81E-005 #	C	18.5113	181.65
RSWS8N_04540	RSWS8N_RS04495	2.8680416158	0.0058837 #	S	10.9762	242.07
RSWS8N_04545	RSWS8N_RS04500	3.000432297	0.0038935 #	R	13.5192	370.6
RSWS8N_04550	RSWS8N_RS04505	3.2033117479	0.0023139 #	V	18.4486	895.09
RSWS8N_04555	RSWS8N_RS04510	3.4087374531	0.0009008 #	C	9.22114	539.29
RSWS8N_04560	RSWS8N_RS04515	3.2077201437	0.0024556 #	C	6.97271	397.05
RSWS8N_04565	RSWS8N_RS04520	4.0889172014	1.86E-006 #	C	13.7964	629.23
RSWS8N_04580	RSWS8N_RS04535	2.5148262466	0.0003005 #	R	5.5586	41.203
RSWS8N_04945	RSWS8N_RS04900	2.1039730397	0.002444 #	S	221.419	1154.1
RSWS8N_05050	RSWS8N_RS05005	-2.3262035926	2.95E-012 #	S	262.952	49.76
RSWS8N_05090	RSWS8N_RS05040	2.4868503522	6.06E-012 #	S	91.2111	548.78
RSWS8N_05115	RSWS8N_RS05065	-2.2658173279	3.05E-008 #	G	264.884	51.057
RSWS8N_05185	RSWS8N_RS05135	2.2062139736	0.0015252 hemA	H	776.474	4409.6
RSWS8N_05330	RSWS8N_RS05290	-2.1759455785	0.0079541 #	T	2074.73	341.83
RSWS8N_05545	RSWS8N_RS05500	2.1193605795	0.0027177 #	G	2.08027	11.589
RSWS8N_05635	RSWS8N_RS05590	-2.4098684547	1.05E-006 #	-	61.1694	9.9651
RSWS8N_05640	RSWS8N_RS05595	-2.4911472204	1.81E-007 #	T	1941.85	307.73
RSWS8N_05645	RSWS8N_RS05600	-2.7000769936	8.82E-011 #	S	3670.03	512.12
RSWS8N_05670	RSWS8N_RS05625	2.169332139	0.0076274 smoE	G	665.122	3987.8
RSWS8N_06035	RSWS8N_RS06000	-4.3711578522	2.63E-023 #	S	1596.32	63.531
RSWS8N_06040	RSWS8N_RS06005	-6.027037059	9.36E-032 flmM2	N	1096.43	11.144
RSWS8N_06180	RSWS8N_RS06145	-2.0510708718	7.30E-005 clpP	O	2222.46	484.08
RSWS8N_06450	RSWS8N_RS06410	-4.9982401634	7.55E-033 motB1	N	170.976	4.3462
RSWS8N_06455	RSWS8N_RS06415	-6.7612890614	7.27E-064 motA1	N	486.912	3.6416
RSWS8N_06460	RSWS8N_RS06420	-7.3880823454	5.80E-046 tlpL	T	5729.04	20.83
RSWS8N_06565	RSWS8N_RS06525	2.6021562336	7.69E-007 dxs	H	199.265	1403.9
RSWS8N_06570	RSWS8N_RS06530	2.2951663164	3.22E-007 pufX	R	2424.98	13046
RSWS8N_06575	RSWS8N_RS06535	2.3387175555	5.24E-007 pufM	C	2000.12	11194
RSWS8N_06580	RSWS8N_RS06540	2.5592608274	2.99E-008 pufL	C	1940.56	12788
RSWS8N_06585	RSWS8N_RS06545	3.0331096111	2.81E-012 pufA	O	5999.08	55442
RSWS8N_06590	RSWS8N_RS06550	2.9989828958	1.28E-014 pufB	C	10142.6	89233
RSWS8N_06595	RSWS8N_RS06555	2.4958679778	4.04E-005 pufQ	C	447.384	3049.1
RSWS8N_06600	RSWS8N_RS06560	2.6071929074	1.47E-005 bchZ	C	239.901	1778.7
RSWS8N_06605	RSWS8N_RS06565	2.2100973381	3.98E-005 bchY	C	105.533	552.98
RSWS8N_06610	RSWS8N_RS06570	2.5357440339	0.0002633 bchX	P	121.66	912.48
RSWS8N_06615	RSWS8N_RS06575	3.0133519213	7.34E-005 bchC	E	74.4623	908.39
RSWS8N_06625	RSWS8N_RS06585	2.9775028265	4.81E-006 crtE	H	74.8836	781.95
RSWS8N_06650	RSWS8N_RS06610	2.7287096	0.0003528 crtI	Q	115.534	1094.9
RSWS8N_06655	RSWS8N_RS06615	2.491888507	0.0004052 crtA	C	107.404	782.39
RSWS8N_06660	RSWS8N_RS06620	2.0133085045	0.0009692 bchI	H	71.4613	331.72
RSWS8N_06715	RSWS8N_RS06675	2.0030892403	0.0027622 bchF	C	72.9363	346.02
RSWS8N_06740	RSWS8N_RS06700	2.0744856619	0.0001103 bchM	H	249.86	1178.7
RSWS8N_06745	RSWS8N_RS06705	2.2442739729	1.82E-007 #	G	377.176	1940.1
RSWS8N_06750	RSWS8N_RS06710	2.4743434186	4.25E-011 puhA	H	1413.61	8432.8
RSWS8N_06825	RSWS8N_RS06785	-3.1189921676	3.67E-013 #	L	789.516	80.168
RSWS8N_06830	RSWS8N_RS06790	-2.276475634	1.41E-006 #	E	680.197	127.03
RSWS8N_06870	RSWS8N_RS06830	2.8063543225	2.60E-006 pucB1	C	11071.7	95914
RSWS8N_06875	RSWS8N_RS06835	2.6370327216	1.18E-006 pucA1	C	8273.87	60452
RSWS8N_06880	RSWS8N_RS06840	3.0455765087	2.02E-005 pucC	G	82.4307	975.76

RSWS8N_07290	RSWS8N_RS07240	2.0431882872	0.0079541	gluD	E	209.54	1087.8
RSWS8N_07350	RSWS8N_RS07305	-3.7378426153	1.13E-009 #		S	534.96	29.078
RSWS8N_07355	RSWS8N_RS07310	-8.6925896228	4.58E-082 #		T	3533.61	5.6389
RSWS8N_07360	RSWS8N_RS07315	-9.5099671559	2.86E-085 #		S	5196.64	4.0158
RSWS8N_07380	RSWS8N_RS07335	-7.3344431343	5.28E-059	pleD	T	1459.98	6.229
RSWS8N_07385	RSWS8N_RS07340	-3.5997061463	1.91E-010 #		S	857.097	54.13
RSWS8N_07390	RSWS8N_RS07345	-3.2046234862	6.40E-007 #		F	860.331	68.836
RSWS8N_07555	RSWS8N_RS07510	-2.4525633542	1.76E-008 #		J	1531.42	254.68
RSWS8N_07560	RSWS8N_RS07515	-3.8881432259	1.79E-012	recA	L	10072.3	517.64
RSWS8N_07565	RSWS8N_RS07520	-2.602264057	8.08E-009 #		R	900.901	133.8
RSWS8N_07570	RSWS8N_RS07525	-7.7482324967	1.14E-115	cckA	T	2195.01	8.3289
RSWS8N_07605	RSWS8N_RS07555	3.5028517873	1.36E-031 #		P	26.2213	317.86
RSWS8N_07610	RSWS8N_RS07560	3.3315501471	1.14E-016 #		M	29.3729	332.11
RSWS8N_07875	RSWS8N_RS07820	-5.2730088413	2.79E-023 #		T	1838.33	33.098
RSWS8N_08060	RSWS8N_RS08005	2.7524474598	6.64E-007 #		P	212.29	1709
RSWS8N_08110	RSWS8N_RS08055	-2.5439883774	8.79E-005 #		S	899.088	124.22
RSWS8N_08145	RSWS8N_RS08090	-5.5586189954	2.16E-058 #		-	1658.94	30.46
RSWS8N_08275	RSWS8N_RS08220	3.3660070494	2.14E-030 #		P	155.872	1713.9
RSWS8N_08375	RSWS8N_RS08325	-2.3796776808	4.10E-005 #		K	8.76171	1.6366
RSWS8N_08415	RSWS8N_RS08355	-2.7882468202	1.30E-012 #		K	42.3334	5.7783
RSWS8N_08765	RSWS8N_RS08710	2.0573589187	0.0041582 #		-	2602.92	13232
RSWS8N_08795	RSWS8N_RS08740	2.0539912995	0.0020902 #		S	32.0056	158.36
RSWS8N_09235	RSWS8N_RS09175	-6.3013430928	2.93E-039	mucS	K	8478.93	75.538
RSWS8N_09490	RSWS8N_RS09430	-8.5039902375	2.90E-065 #		T	2163.76	3.3614
RSWS8N_09495	RSWS8N_RS09435	-2.5635158057	7.89E-009 #		J	345.238	52.148
RSWS8N_09735	RSWS8N_RS09675	-3.3701006205	2.24E-013 #		I	310.7	25.426
RSWS8N_09785	RSWS8N_RS09725	-4.0955655319	3.88E-014	osp	T	1333.68	60.004
RSWS8N_10025	RSWS8N_RS09965	2.1661234357	0.0020694 #		S	24.5976	137.78
RSWS8N_10080	RSWS8N_RS10015	-2.8019912703	2.45E-017 #		V	120.829	15.975
RSWS8N_10550	RSWS8N_RS10485	-2.0721903558	0.0011021 #		C	228.795	46.362
RSWS8N_10755	RSWS8N_RS10695	-2.009077511	2.59E-012	merA	S	146.932	35.311
RSWS8N_10780	RSWS8N_RS10720	-7.441261296	1.34E-055 #		T	1620.56	6.0523
RSWS8N_10920	RSWS8N_RS10860	-2.5061549125	0.001006 #		G	374.632	48.211
RSWS8N_10925	RSWS8N_RS10865	-2.4136912525	0.0001381 #		S	1425.55	219.75
RSWS8N_10930	RSWS8N_RS10870	-2.5185481704	3.45E-005 #		S	2136.8	307.98
RSWS8N_11035	RSWS8N_RS10975	-6.0089576619	4.16E-025 #		O	485.352	4.556
RSWS8N_11040	RSWS8N_RS10980	-3.1090323705	3.27E-006 #		Q	245.076	21.035
RSWS8N_11045	RSWS8N_RS10985	-5.1952436818	4.97E-058 #		R	67.1688	1.5497
RSWS8N_11050	RSWS8N_RS10990	-5.0051575746	5.91E-038 #		M	59.3086	1.2627
RSWS8N_11055	RSWS8N_RS10995	-5.3011546743	2.72E-040 #		S	68.6029	1.3426
RSWS8N_11060	RSWS8N_RS11000	-8.2681632234	7.29E-075 #		M	1535.62	3.3674
RSWS8N_11065	RSWS8N_RS11005	-5.8554465127	4.74E-040	aprD	V	834.79	11.133
RSWS8N_11070	RSWS8N_RS11010	-6.8775602483	8.82E-062 #		V	662.623	4.2685
RSWS8N_11075	RSWS8N_RS11015	-8.0944024492	3.82E-057 #		R	3469.27	7.7473
RSWS8N_11080	RSWS8N_RS11020	-7.0897021262	2.96E-056 #		-	2632.59	14.078
RSWS8N_11085	RSWS8N_RS11025	-5.519642344	2.75E-026	dnaE2	L	1146.66	17.454
RSWS8N_11090	RSWS8N_RS11030	-2.7058140085	1.47E-011	mltB	M	305.873	42.972
RSWS8N_11320	RSWS8N_RS11260	-6.187350751	8.15E-034 #		P	1397.33	12.789
RSWS8N_11325	RSWS8N_RS11265	-7.8504143294	3.59E-062	radC	L	2318.74	6.3537

RSWS8N_11370	RSWS8N_RS11310	2.1886580511	0.0031266	xyIF	G	840.577	4847.3
RSWS8N_11440	RSWS8N_RS11380	-4.2995376035	4.55E-037	comF	R	202.205	9.0975
RSWS8N_11475	RSWS8N_RS11415	-2.1782792968	9.35E-008	#	J	200.878	41.434
RSWS8N_11505	RSWS8N_RS11445	-3.3202513131	2.52E-017	#	L	126.191	12.137
RSWS8N_11510	RSWS8N_RS11450	-5.1289994118	8.33E-041	#	T	142.692	3.2549
RSWS8N_11515	RSWS8N_RS11455	-2.8721749865	1.30E-012	#	-	242.441	29.377
RSWS8N_11705	RSWS8N_RS11645	2.383307456	1.80E-017	#	G	60.5481	328.72
RSWS8N_11870	RSWS8N_RS11805	2.745134688	0.000224	#	O	143.408	1349.5
RSWS8N_11875	RSWS8N_RS11810	4.7638780962	1.35E-013	cbbS	C	54.3405	2463.1
RSWS8N_11880	RSWS8N_RS11815	4.5148003487	1.14E-011	cbbL	G	48.4051	1861.8
RSWS8N_11885	RSWS8N_RS11820	4.14715147	6.30E-009	cbbA	G	32.0682	995.88
RSWS8N_11990	RSWS8N_RS11920	-4.4177879116	1.72E-024	motB2	N	677.045	26.408
RSWS8N_11995	RSWS8N_RS11925	-8.5098124221	2.74E-060	flgE2	N	11699.6	17.922
RSWS8N_12000	RSWS8N_RS11930	-9.3306489523	3.92E-097	flgK2	N	5997.19	5.8456
RSWS8N_12005	RSWS8N_RS11935	-8.6668801849	9.54E-100	flgL2	N	5818.43	10.201
RSWS8N_12010	RSWS8N_RS11940	-5.8267448108	4.80E-033	flgI2	N	3918.36	49.784
RSWS8N_12015	RSWS8N_RS11945	-3.295611204	9.69E-013	#	T	426.173	37.322
RSWS8N_12025	RSWS8N_RS11955	-4.5078072174	5.47E-017	fliP2	N	1407.62	45.803
RSWS8N_12030	RSWS8N_RS11960	-8.9076983891	1.58E-087	fliN2	N	2374.01	3.2941
RSWS8N_12035	RSWS8N_RS11965	-10.229782807	4.10E-084	fliH2	N	2752.6	1.1513
RSWS8N_12040	RSWS8N_RS11970	-9.5126792074	1.53E-107	fliF2	N	4336.18	3.8249
RSWS8N_12045	RSWS8N_RS11975	-9.1171206411	1.36E-086	fliL2	N	3310.58	3.7312
RSWS8N_12050	RSWS8N_RS11980	-7.6155125689	1.16E-073	#	N	4360.92	16.05
RSWS8N_12055	RSWS8N_RS11985	-7.0871234006	5.15E-071	#	N	3107.18	17.939
RSWS8N_12060	RSWS8N_RS11990	-6.5219310058	5.89E-040	motA2	N	2740.51	20.581
RSWS8N_12065	RSWS8N_RS11995	-8.2932080745	2.82E-107	#	N	2034.56	4.8726
RSWS8N_12070	RSWS8N_RS12000	-8.1283721484	1.46E-065	#	N	2590.54	6.2757
RSWS8N_12075	RSWS8N_RS12005	-6.4283916585	1.55E-036	flhA2	N	1487.41	11.569
RSWS8N_12080	RSWS8N_RS12010	-4.912392031	6.78E-027	fliR2	N	1230.54	32.466
RSWS8N_12085	RSWS8N_RS12015	-6.5148263506	1.13E-052	flhB2	N	990.146	8.1315
RSWS8N_12090	RSWS8N_RS12020	-6.9183294654	7.32E-054	#	-	588.956	3.005
	RSWS8N_RS12025	-7.1566286311	4.06E-055	#	N	1495.46	7.6125
RSWS8N_12095	RSWS8N_RS12030	-8.6770506926	2.04E-082	flgH2	N	3533.41	5.4436
RSWS8N_12100	RSWS8N_RS12035	-8.6276846997	1.31E-073	flgA2	N	3915.6	5.8475
RSWS8N_12105	RSWS8N_RS12040	-9.1931521841	7.61E-098	flgG2	N	4778.94	5.2706
RSWS8N_12110	RSWS8N_RS12045	-9.8251689889	5.80E-112	flgF2	N	6838.86	4.5726
RSWS8N_12115	RSWS8N_RS12050	-9.9310822737	3.71E-131	fliQ2	N	8573.99	5.9952
RSWS8N_12120	RSWS8N_RS12055	-10.009274432	1.52E-153	fliE2	N	10967.9	7.2895
RSWS8N_12125	RSWS8N_RS12060	-8.0596716836	3.08E-040	flgC2	N	7445.35	12.442
RSWS8N_12130	RSWS8N_RS12065	-9.1810620226	1.37E-085	flgB2	N	4277.52	4.9516
RSWS8N_12135	RSWS8N_RS12070	-7.8230945055	3.12E-084	fliI2	N	1590.19	5.1847
RSWS8N_12140	RSWS8N_RS12075	-8.4397408799	3.27E-064	#	N	4205.36	7.5611
RSWS8N_12145	RSWS8N_RS12080	-7.8855197061	1.37E-052	flgJ2	N	5866.03	15.133
RSWS8N_12155	RSWS8N_RS12085	-7.3844482477	9.11E-049	fliK	N	5594.19	21.635
RSWS8N_12160	RSWS8N_RS12090	-7.7477407366	2.42E-069	flgD2	N	6200.07	20.333
RSWS8N_12165	RSWS8N_RS12095	-3.6514899166	6.13E-015	ubiB	H	1237.22	82.318
RSWS8N_12260	RSWS8N_RS12190	-7.5482622228	8.01E-082	pleC	T	758.305	3.0785
RSWS8N_12265	RSWS8N_RS12195	-2.9114371952	0.0058964	#	L	212.245	7.8103
RSWS8N_12270	RSWS8N_RS12200	-3.2712495912	6.44E-013	recQ	L	267.368	23.781

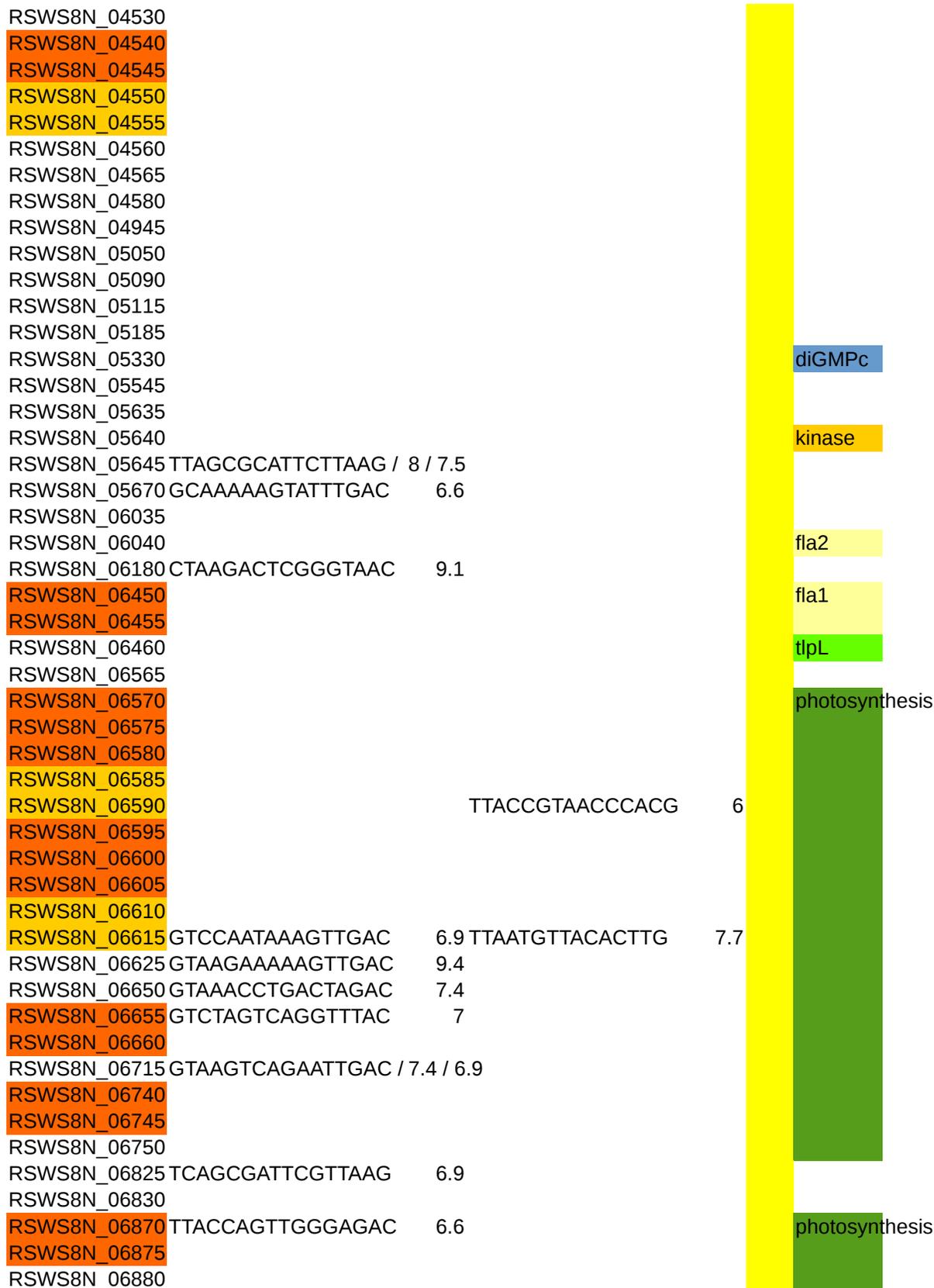
RSWS8N_12275	RSWS8N_RS12205	-2.9946099417	6.33E-019	yggT	S	972.59	113.71
RSWS8N_12365	RSWS8N_RS12295	-7.2422889383	1.53E-055	#	E	466.876	2.0377
RSWS8N_12505	RSWS8N_RS12440	2.2954594635	0.0025922	#	N	253.547	1631
RSWS8N_12595	RSWS8N_RS12540	-2.1510217131	1.32E-006	#	R	89.8322	18.903
RSWS8N_12605	RSWS8N_RS12550	2.0370734941	0.0041472	fhuB	P	13.8952	69.303
RSWS8N_12705	RSWS8N_RS12650	-5.9752309496	1.94E-031	#	C	506.729	6.7684
RSWS8N_12760	RSWS8N_RS12705	2.7407269266	4.81E-006	#	I	29.3736	242.05
RSWS8N_12930	RSWS8N_RS12870	-7.5863240343	8.68E-039	rsbW	T	1475.77	4.0363
RSWS8N_12935	RSWS8N_RS12875	-6.8960212396	5.16E-023	rsbV	T	2137.93	6.4093
RSWS8N_13045	RSWS8N_RS12990	-7.7080738417	2.43E-064	divL	T	748.972	2.3419
RSWS8N_13080	RSWS8N_RS13025	-8.0476355253	1.95E-064	#	S	2391.19	5.8389
RSWS8N_13225	RSWS8N_RS13160	2.5998866693	5.85E-005	pucB2	C	584.534	4451.5
RSWS8N_13230	RSWS8N_RS13165	2.5495851046	0.0003786	pucA2	C	258.196	1996
RSWS8N_13255	RSWS8N_RS13190	-2.3662170237	2.08E-011	#	C	120.371	22.206
RSWS8N_13265	RSWS8N_RS13200	2.0658489341	0.0035448	appA	K	275.425	1402.1
RSWS8N_13360	RSWS8N_RS13295	-3.5237986294	5.80E-006	cheY3	T	2955.14	146.34
RSWS8N_13365	RSWS8N_RS13300	-4.4399659745	5.39E-008	cheA2	T	7099.12	126.86
RSWS8N_13370	RSWS8N_RS13305	-4.3585036174	1.57E-007	cheW2	T	6620.7	121.1
RSWS8N_13375	RSWS8N_RS13310	-4.6445444513	1.44E-009	cheW3	T	6950.78	122.15
RSWS8N_13380	RSWS8N_RS13315	-5.0233880846	5.94E-015	cheR2	O	5092.22	90.398
RSWS8N_13385	RSWS8N_RS13320	-5.2017225387	1.74E-020	cheB1	T	4149.35	75.171
RSWS8N_13390	RSWS8N_RS13325	-5.3209819705	3.71E-015	tlpC	T	3869.39	49.162
RSWS8N_13680	RSWS8N_RS13625	-2.3486034876	1.11E-010	#	U	159.754	29.211
RSWS8N_14040	RSWS8N_RS13990	-2.9720591583	3.50E-011	#	K	2727.24	307.05
RSWS8N_14045	RSWS8N_RS13995	-3.0690447882	9.15E-009	#	-	4068.83	401.29
RSWS8N_14050	RSWS8N_RS14000	-2.5304444937	4.77E-009	#	J	639.534	100.51
RSWS8N_14195	RSWS8N_RS14140	-2.1475001553	6.81E-007	#	K	51.244	9.8036
RSWS8N_14200	RSWS8N_RS14145	-2.5229994545	3.26E-017	#	P	137.651	22.953
RSWS8N_14205	RSWS8N_RS14150	-3.1444784688	2.56E-013	ssb	L	1908.16	190.82
RSWS8N_14310	RSWS8N_RS14255	-5.0915362603	7.01E-025	rsml	G	3711.47	81.191
RSWS8N_14315	RSWS8N_RS14260	-6.2823134547	7.48E-039	#	L	8402.52	75.621
RSWS8N_14320	RSWS8N_RS14265	-4.4271981539	4.78E-023	gshB	H	1953.01	74.011
RSWS8N_14325	RSWS8N_RS14270	-5.3896143444	4.57E-031	comM	O	408.338	7.3124
RSWS8N_14330	RSWS8N_RS14275	-2.4471244018	3.21E-005	#	S	752.48	117.28
RSWS8N_14555	RSWS8N_RS14495	-2.7547373643	1.41E-016	sleB	M	259.035	35.543
RSWS8N_14620	RSWS8N_RS14560	-4.4482741233	4.37E-022	pulE/tfp	M	517.447	19.011
RSWS8N_14665	RSWS8N_RS14610	-4.128502897	5.57E-028	potD	E	5715.82	287.06
RSWS8N_14670	RSWS8N_RS14615	-4.1147521326	2.04E-029	potB	P	2311.33	118.06
RSWS8N_14675	RSWS8N_RS14620	-3.8666206385	7.21E-035	potC	E	2126.56	134.16
RSWS8N_14745	RSWS8N_RS14690	-3.1433097049	2.05E-010	#	O	260.811	24.792
RSWS8N_14750	RSWS8N_RS14695	-2.3614783473	1.02E-008	cpaA	S	89.5519	15.586
RSWS8N_14755	RSWS8N_RS14700	-2.5916381368	4.51E-009	#	S	222.826	33.01
RSWS8N_14765	RSWS8N_RS14710	-2.8048117319	7.73E-009	tadC	U	944.884	117.91
RSWS8N_14770	RSWS8N_RS14715	-3.3729519865	4.09E-015	tadB	U	1327.92	112.09
RSWS8N_14775	RSWS8N_RS14720	-3.3700515887	1.10E-014	cpaF	U	1264.43	106.47
RSWS8N_14780	RSWS8N_RS14725	-2.9847536533	1.22E-010	cpaE	U	1030.43	113.73
RSWS8N_14895	RSWS8N_RS14845	-2.9131677736	1.57E-011	dusA	J	414.381	48.913
RSWS8N_15374	RSWS8N_RS15225	-2.2139443703	1.29E-017	#	K	42.5739	8.491
RSWS8N_15379	RSWS8N_RS15230	-4.2058058803	1.27E-033	#	C	356.678	17.248

RSWS8N_15389	RSWS8N_RS15235	-8.1856276668	1.42E-093 #	R	739.701	1.7828
RSWS8N_15484	RSWS8N_RS15330	2.4493058224	9.18E-006 #	G	86.6925	551.01
RSWS8N_15514	RSWS8N_RS15360	-2.7141978151	2.29E-009 #	C	618.892	83.918
RSWS8N_15519	RSWS8N_RS15365	-2.1419677626	0.001415 mcpJ	T	954.723	179.88
RSWS8N_15599	RSWS8N_RS15445	-5.7324687379	8.16E-040 #	R	246.903	3.5008
RSWS8N_15604	RSWS8N_RS15450	-2.211061632	7.63E-008 #	R	32.0271	6.5058
RSWS8N_15999	RSWS8N_RS15810	-3.2603498565	1.99E-011 #	R	66.3318	6.3557
RSWS8N_16679	RSWS8N_RS16535	2.42401941	0.0008885 #	S	68.8467	482.75
RSWS8N_16704	RSWS8N_RS16560	4.1020750773	1.24E-012 rsiW	K	73.5143	1748.6
RSWS8N_16769	RSWS8N_RS16625	-2.4580716243	0.0017271 #	P	819.676	108.37
RSWS8N_16774	RSWS8N_RS16630	-3.3969110554	2.97E-005 #	S	3017.53	157.8
RSWS8N_16779	RSWS8N_RS16635	-9.3622434342	9.24E-082 #	C	3571.28	2.8289
RSWS8N_16784	RSWS8N_RS16640	-9.5755017752	4.22E-106 mcpR	T	4654.71	3.8424
RSWS8N_16959	RSWS8N_RS16820	-5.6368959733	1.09E-049 #	S	846.198	14.165
RSWS8N_17349	RSWS8N_RS17210	-9.7113946225	1.83E-108 #	-	2776.94	2.0618
RSWS8N_17584	RSWS8N_RS17440	2.4275858847	9.68E-005 prkB/cb	C	23.9171	156.09
RSWS8N_17589	RSWS8N_RS17445	2.7034768883	4.92E-007 tkt/tklB	G	19.0808	146.55
RSWS8N_17594	RSWS8N_RS17450	2.2679319713	6.41E-011 gap/cbbG	G	18.6358	95.04
RSWS8N_17599	RSWS8N_RS17455	2.0187196442	3.78E-011 cbbA	G	16.6212	70.206
RSWS8N_17604	RSWS8N_RS17460	2.0323265192	1.65E-008 cbbM	G	39.165	168.91
RSWS8N_17609	RSWS8N_RS17465	2.5215963396	0.0007657 ggt	E	91.7216	712.01
RSWS8N_17854	RSWS8N_RS17715	2.0291234227	0.0044594 #	S	50.4805	250.36
RSWS8N_18044	RSWS8N_RS17905	-2.3096358045	2.93E-008 #	L	24.2805	4.6167
RSWS8N_18079	RSWS8N_RS17940	-2.6718124688	6.08E-009 #	E	48.2244	7.5143
RSWS8N_18084	RSWS8N_RS17945	-2.097972879	5.53E-006 #	F	23.7329	5.3546
RSWS8N_18089	RSWS8N_RS17950	-2.9474743471	1.62E-009 #	V	35.7192	4.5696
RSWS8N_18094	RSWS8N_RS17955	-3.266127076	1.86E-011 #	S	18.5744	1.5947
RSWS8N_18099	RSWS8N_RS17960	-3.3235546972	9.42E-013 #	-	20.6691	1.2866
RSWS8N_18104	RSWS8N_RS17965	-3.1112608167	1.25E-011 #	T	11.3904	0.8478
RSWS8N_18274	RSWS8N_RS18140	-3.0422479075	4.65E-017 #	-	115.493	13.346
RSWS8N_18409	RSWS8N_RS18270	3.8078344416	7.35E-010 #	P	11.7755	233.71
RSWS8N_18414	RSWS8N_RS18275	3.4676026467	3.16E-008 #	-	5.2109	79.293
RSWS8N_18419	RSWS8N_RS18280	2.4580410514	0.0005814 ttuC	C	6.67229	47.679
RSWS8N_18424	RSWS8N_RS18285	2.2097580707	0.00097 yeaU	C	8.90568	50.227
RSWS8N_18574	RSWS8N_RS18435	-8.2805214783	2.47E-068 mcpV	T	6235.68	12.617
RSWS8N_18579	RSWS8N_RS18445	-7.7321627351	2.42E-064 #	R	5144.75	15.678
RSWS8N_18584	RSWS8N_RS18450	-5.8918643678	1.13E-032 #	-	4655.5	55.305
RSWS8N_18589	RSWS8N_RS18455	-2.9529952152	0.0001014 #	L	1677.29	145.55
RSWS8N_18594	RSWS8N_RS18460	-3.855958109	4.64E-028 csgA	I	442.782	27.302
RSWS8N_18819	RSWS8N_RS18685	2.0492642337	3.24E-005 #	S	28.8231	131.01
RSWS8N_19344	RSWS8N_RS19195	4.2439885256	1.98E-042 sqr	C	47.4172	981.77
RSWS8N_19389	RSWS8N_RS19240	-2.9509842929	2.22E-012 galM	G	203.765	23.562
RSWS8N_19394	RSWS8N_RS19245	-6.0314892256	4.75E-041 gvpA1	D	7795.54	88.836
RSWS8N_19399	RSWS8N_RS19250	-4.7173389368	3.44E-019 hutH	E	1818.68	50.814
RSWS8N_19404	RSWS8N_RS19255	-7.5078308429	2.29E-057 gvpK	GAS	2280.4	7.6308
RSWS8N_19409	RSWS8N_RS19260	-6.740961249	1.26E-043 gvpL/F	GAS	1931.09	12.562
RSWS8N_19414	RSWS8N_RS19265	-8.2891158847	1.07E-064 gvpS	E	2300.02	4.1678
RSWS8N_19419	RSWS8N_RS19270	-7.9889842798	6.03E-074 gvpL/F	GAS	3049.31	8.3317
RSWS8N_19424	RSWS8N_RS19275	-9.2071988508	9.34E-104 gvpL/F	GAS	3821.44	4.2021

RSWS8N_19429	RSWS8N_RS19280	-9.0664424778	6.34E-078	gvpG	GAS	6762.05	7.0894
RSWS8N_19434	RSWS8N_RS19285	-8.9836817025	1.18E-109	gvpL/F	GAS	5603.53	7.9027
RSWS8N_19439	RSWS8N_RS19290	-8.601856354	8.77E-080	gvpH	O	8917.36	15.205
RSWS8N_19444	RSWS8N_RS19295	-8.6603683685	2.07E-083	gvpA2	GAS	7750.29	12.606
RSWS8N_19449	RSWS8N_RS19300	-11.252801832	1.27E-105	gvpO	GAS	7670.45	1.4988
RSWS8N_19454	RSWS8N_19454	-11.928639533	2.14E-081	gvpX	GAS	10165.9	0.1215
RSWS8N_19459	RSWS8N_RS19305	-9.9315674628	4.49E-095	gvpN	GAS	9145.82	5.3379
	RSWS8N_RS19530	-2.4567801829	4.27E-006	#	S	7.89225	1.0259
RSWS8N_19714	RSWS8N_RS19535	-3.0264081694	5.06E-015	kdsA	M	695.354	77.685
RSWS8N_19719	RSWS8N_RS19540	-5.7772653817	1.85E-033	#	S	1663.08	21.745
RSWS8N_19724	RSWS8N_RS19545	-7.9959555163	4.34E-074	#	U	1022.23	2.8593
RSWS8N_19729	RSWS8N_RS19550	-9.5076635543	5.42E-100	#	V	1858.8	1.5791
RSWS8N_19734	RSWS8N_RS19555	-7.699365749	1.89E-069	#	O	1226.44	4.1715
RSWS8N_19739	RSWS8N_RS19560	-10.538385291	1.53E-127	#	S	3581.9	1.4962
RSWS8N_19744	RSWS8N_RS19565	-4.3473841986	2.43E-045	#	Q	171.538	7.7645
RSWS8N_19804	RSWS8N_RS19625	2.3667513073	2.06E-011	#	S	30.8194	170.6
RSWS8N_19864	RSWS8N_RS19680	-9.8997704613	2.60E-101	flaA	N	6463.55	4.2113
RSWS8N_19869	RSWS8N_RS19685	-7.6911239455	9.80E-036	flaF	N	3905.51	8.6914
RSWS8N_19874	RSWS8N_RS19690	-7.7886286494	4.41E-061	flbT	N	3019.87	9.46
RSWS8N_19879	RSWS8N_RS19695	-6.9326572958	1.99E-060	#	N	1730.65	10.823
RSWS8N_19949	RSWS8N_RS19765	-2.2868195601	6.31E-008	#	M	23.2843	4.6197
RSWS8N_20109	RSWS8N_RS19915	2.3125961596	0.0006784	#	-	328.679	2021.5
RSWS8N_20139	RSWS8N_RS19945	-3.3134790703	1.65E-017	#	S	29.8282	2.6071
RSWS8N_20234	RSWS8N_RS20035	2.3734695661	2.51E-008	#	O	15.3213	86.868
RSWS8N_20524	RSWS8N_RS20315	-2.9178285819	7.93E-016	#	L	111.39	13.491
	RSWS8N_RS20370	-2.4775453678	1.31E-005	#	K	31.25	4.0096
	RSWS8N_RS20375	-3.1506755926	4.42E-016	mcp	T	131.367	12.17
	RSWS8N_RS20380	-3.1607418699	7.70E-011	#	S	782.82	74.893
RSWS8N_21144	RSWS8N_RS20930	2.3366567919	1.16E-008	#	N	79.2604	433.21

8. Identificación de posibles sitios de unión de CtrA

operon	complete	BindigSite (1e-4)		score	mol	function
		score	half			
RSWS8N_00215	TTAACCTTTCTGAAAC	8			chrI	
RSWS8N_00565						
RSWS8N_00655	TTTACCTTCAATTAAC	10.5				
RSWS8N_00660	TTAATTGAAGGTAAAG	10.3				uvrB
RSWS8N_00665	TTAACCCGTCGTTAAC	12.9				
RSWS8N_00680						
RSWS8N_01110	TTAACGGCTGGTGAAC	9.7				
RSWS8N_01115	TTCACCAGCCGTTAAC	9.6				
RSWS8N_01355						
RSWS8N_01360	CTAAGGCGGCCTTAAC	9				fla2
RSWS8N_01390						
RSWS8N_01610						
RSWS8N_01655						
RSWS8N_01660						
RSWS8N_01665						
RSWS8N_01670						
RSWS8N_01835						groES
RSWS8N_01840						groEL
RSWS8N_01905			TTAAGATGTTTACTG	7.4		
RSWS8N_02190						
RSWS8N_02290			TTAAAACGTCCATGG / 6 / 6.2			rpoHI
RSWS8N_02395						
RSWS8N_02400						
RSWS8N_02405						cheOp1
RSWS8N_02410						
RSWS8N_02415						
RSWS8N_02420						
RSWS8N_02425						
RSWS8N_02430						
RSWS8N_02435						
RSWS8N_02440						
RSWS8N_02445						
RSWS8N_02450						
RSWS8N_02455						
RSWS8N_02460						
RSWS8N_02465	TTAGGGAAACCTTATG	7.5				
RSWS8N_02565	TTACCGAAAGGTTAAG	10.2				RsGTA
RSWS8N_02570						
RSWS8N_02575						
RSWS8N_02580						
RSWS8N_03105	ATACTTTGGGCTTAAA	7.4				
RSWS8N_03315	TTCACCGATGATTAAG	7.3				CtrA regulation
RSWS8N_03400						
RSWS8N_03435			TTAACCGAATGAAA	7.3		
RSWS8N_03930						
RSWS8N_RS043	TTAACGAACAGGTAAC	11	TTTAGGAATTAGAAA	6.2		
RSWS8N_04455						

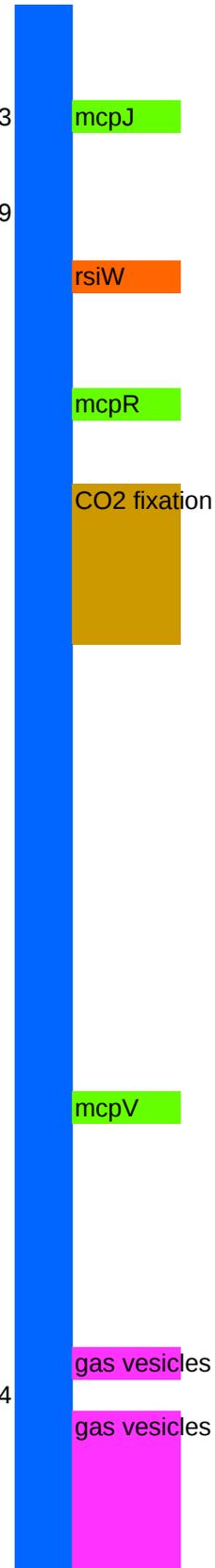


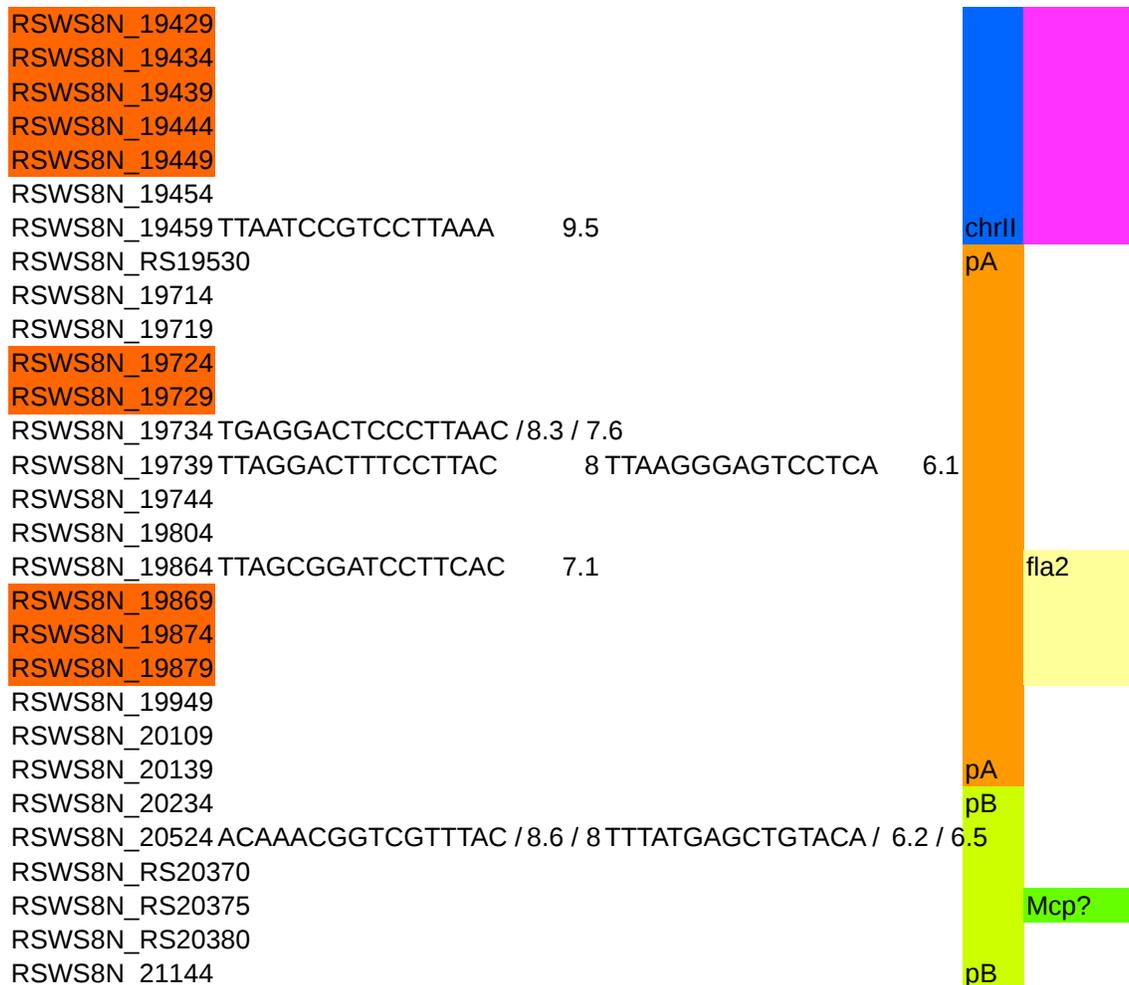
RSWS8N_07290				
RSWS8N_07350				
RSWS8N_07355				diGMPc
RSWS8N_07360	TTGGGATCTTGTTAAG	7.8		
RSWS8N_07380	GAAAGGAAACCTTAAC	8.3	TTAACCAGTTCCCCG	7.1
RSWS8N_07385				diGMPc CtrA regulator
RSWS8N_07390				
RSWS8N_07555				
RSWS8N_07560	TAACTAGCCCTTAAC	11.1		recA
RSWS8N_07565	TTAAGGGCTAGTTTAA	11		
RSWS8N_07570	TTAAACAGTGCTTAAC	11.8		cckA
RSWS8N_07605				
RSWS8N_07610				
RSWS8N_07875	TTAAGGTTTCGGGAAA	7.2		kinase
RSWS8N_08060				
RSWS8N_08110				
RSWS8N_08145	TAAAGGAATGGTGCAC	6.6		
RSWS8N_08275	TTATTATTCCGTTAT	7		
RSWS8N_08375				
RSWS8N_08415				
RSWS8N_08765				
RSWS8N_08795				
RSWS8N_09235			TTTACGCTATGTTTG	7.5
RSWS8N_09490	TTAACCCGATCTTGAC	7		response regulator
RSWS8N_09495				
RSWS8N_09735				
RSWS8N_09785	TTAACACGCGTTAAA / 10.8 / GTAAGTAGCAGTTGC	6.1		CtrA regu response regu
RSWS8N_10025				
RSWS8N_10080				
RSWS8N_10550				
RSWS8N_10755				
RSWS8N_10780	TTAACCTTCCACTGAG	6.7		diGMPc
RSWS8N_10920				
RSWS8N_10925				
RSWS8N_10930	TTAACGTCCTTCTTAC	7.2		
RSWS8N_11035	TTAACTCCTGCGTAAG / 8 / 10. TTTAGGCTTTGTCTGA / 6 / 6.4			
RSWS8N_11040	TTACGCAGGAGTTAAG / 9.4 / 12			
RSWS8N_11045				
RSWS8N_11050				
RSWS8N_11055				
RSWS8N_11060				
RSWS8N_11065				
RSWS8N_11070				
RSWS8N_11075				
RSWS8N_11080				
RSWS8N_11085				
RSWS8N_11090				
RSWS8N_11320				
RSWS8N_11325	TTAACATTCTGCAAC	6.9		

RSWS8N_11370	TCAACTTTACTTTGAC	8.1	
RSWS8N_11440			
RSWS8N_11475			
RSWS8N_11505			
RSWS8N_11510	TTCACGCTGCCTTAAG	7	response regulator
RSWS8N_11515	TTAAGGCAGCGTGAAG	7.9	
RSWS8N_11705			
RSWS8N_11870			
RSWS8N_11875			
RSWS8N_11880			
RSWS8N_11885			
RSWS8N_11990	TTAAGGCTCCCTTAC	8	
RSWS8N_11995	TTAGGCGGGTGTTAAG	10.2	fla2
RSWS8N_12000			6.5
RSWS8N_12005			
RSWS8N_12010			
RSWS8N_12015			kinase
RSWS8N_12025			
RSWS8N_12030			
RSWS8N_12035			
RSWS8N_12040	CTAACCGATTGTTAAG	9.7	
RSWS8N_12045	TTAACAATCGGTTAGG	9.3	
RSWS8N_12050			
RSWS8N_12055			
RSWS8N_12060	GTGAAGTTATCTTAAC	8.3	TTAACCCCGCCTTGC
RSWS8N_12065			7.4
RSWS8N_12070	CCAAGGCACCGCTAAC	6.7	CTAACCGTTTCCCAA
RSWS8N_12075			6.2
RSWS8N_12080			
RSWS8N_12085			
RSWS8N_12090			
RSWS8N_RS12025			
RSWS8N_12095			
RSWS8N_12100			
RSWS8N_12105			
RSWS8N_12110			
RSWS8N_12115			
RSWS8N_12120			
RSWS8N_12125			
RSWS8N_12130	TTAAGCCTTGGTGAAA	8.4	CTTACCCTTTCTAAA
RSWS8N_12135	TTCACCAAGGCTTAAG	7.2 / 7.0	6.7
RSWS8N_12140			
RSWS8N_12145	ATTACGGAACATTAC	7.7	
RSWS8N_12155			
RSWS8N_12160			
RSWS8N_12165			
RSWS8N_12260	TTAAGAAGAGATTCA	5.9	CtrA regu kinase
RSWS8N_12265			
RSWS8N_12270			

RSWS8N_12275	GTAAGGATACATCAAT	6.8	TATACCTGTCTTTGA	5.9	
RSWS8N_12365					
RSWS8N_12505					
RSWS8N_12595					
RSWS8N_12605					
RSWS8N_12705					
RSWS8N_12760					
RSWS8N_12930					rsbW
RSWS8N_12935					rsbV
RSWS8N_13045	TTAACGGCCCCTTAAC	11.4			CtrA regulation
RSWS8N_13080	TTAAGCGCACCTTAGC	8.8			
RSWS8N_13225					photosynthesis
RSWS8N_13230					
RSWS8N_13255					
RSWS8N_13265					
RSWS8N_13360					cheOp2
RSWS8N_13365					
RSWS8N_13370					
RSWS8N_13375					
RSWS8N_13380					
RSWS8N_13385					
RSWS8N_13390					
RSWS8N_13680	TTAGGCATTTGGCAAC	6.7			
RSWS8N_14040					
RSWS8N_14045					
RSWS8N_14050					
RSWS8N_14195	GCAACTATAGTTCAA	6.5			
RSWS8N_14200			TGAACCTATAGTTGC	6.5	
RSWS8N_14205	TAGCCATTCCGTTAAC	8.5	TTAACCACATCCGGG	6.6	
RSWS8N_14310					
RSWS8N_14315					
RSWS8N_14320					
RSWS8N_14325	GTTAACGCTCGTTAAA	8.6			
RSWS8N_14330					
RSWS8N_14555	no		TTAAGGACTTTCCGG	6.6	
RSWS8N_14620	GTTATCGTAGTTTACG	6.6	TTTACGATCTCTTAA	7	
RSWS8N_14665	TTAACTCCGTAGTAAC	10.9			
RSWS8N_14670					
RSWS8N_14675					
RSWS8N_14745					
RSWS8N_14750					
RSWS8N_14755					
RSWS8N_14765					
RSWS8N_14770					
RSWS8N_14775					
RSWS8N_14780	ATAACGTATTTTTAGC	8.8			pilus
RSWS8N_14895	GTATAAGTGACTGAAC /	7.5 / 9	TTAACCCCGCGGCTG	6.2	chrI
RSWS8N_15374			TTAAAGGTTTCGGCAG	6	chrII
RSWS8N_15379					

RSWS8N_15389	TTGCCGTGTGGTTAAA / 7.7 / 7.1		
RSWS8N_15484			
RSWS8N_15514			
RSWS8N_15519		TTAAGGCTTTTCCTC	6.3
RSWS8N_15599			
RSWS8N_15604			
RSWS8N_15999	GTAGGTCTGCCTTAAC	9.2 TTAACCAATATTGGT	7.9
RSWS8N_16679			
RSWS8N_16704			
RSWS8N_16769			
RSWS8N_16774			
RSWS8N_16779			
RSWS8N_16784			
RSWS8N_16959			
RSWS8N_17349			
RSWS8N_17584			
RSWS8N_17589			
RSWS8N_17594			
RSWS8N_17599			
RSWS8N_17604			
RSWS8N_17609			
RSWS8N_17854			
RSWS8N_18044			
RSWS8N_18079			
RSWS8N_18084			
RSWS8N_18089			
RSWS8N_18094			
RSWS8N_18099			
RSWS8N_18104			
RSWS8N_18274			
RSWS8N_18409	TCAAGGAACAGTCTAC		6.5
RSWS8N_18414			
RSWS8N_18419			
RSWS8N_18424			
RSWS8N_18574	TTTACCGTTCGTTCAA		7.3
RSWS8N_18579			
RSWS8N_18584			
RSWS8N_18589			
RSWS8N_18594			
RSWS8N_18819			
RSWS8N_19344			
RSWS8N_19389			
RSWS8N_19394	TTACCTGTTTCATCCC		6.6
RSWS8N_19399	GAAACTCTGCATTAAC	7.8 TTAACCAGCTTCCAC	7.4
RSWS8N_19404			
RSWS8N_19409			
RSWS8N_19414			
RSWS8N_19419			
RSWS8N_19424			





function	color
flagella	light yellow
chemotaxis	light green
gas vesicles	pink
stress	orange
GTA	dark purple
diGMPc	light blue
CtrA regulation	yellow
signal transduction	gold
photosynthesis	green
CO2 fixation	brown
pilus	light green

Referencias

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. 215: 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Barnett MJ, Hung DY, Reisenauer A, Shapiro L & Long SR. 2001. **A Homolog of the CtrA Cell Cycle Regulator Is Present and Essential in *Sinorhizobium meliloti***. Journal of Bacteriology. 183(10): 3204-3210. doi: 10.1128/JB.183.10.3204-3210.2001.
- Boyer HW & Roulland-Dussoix D. 1969. **A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli***. J Mol Biol. 41(3): 459-472.
- Brilli M, Fondi M, Fani R, Mengoni A, Ferri L, Bazzicalupo M, Biondi EG. 2010. **The diversity and evolution of cell cycle regulation in alpha-proteobacteria: a comparative genomic analysis**. BMC Syst Biol, 4:52. doi: 10.1186/1752-0509-4-52.t
- Buchfink B, Xie C and Huson DH. 2015. **Fast and Sensitive Protein Alignment using DIAMOND**. Nature Methods. 12: 59–60. doi:10.1038/nmeth.3176.
- Cox M & Nelson D. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 10.1007/978-3-662-08289-8.
- DasSarma S, Arora P, Lin F, Molinari E, & Yin LR. 1994. **Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the gvp gene cluster of *Halobacterium halobium* plasmid pNRC100**. J Bacteriol. 176(24): 7646–7652.
- de Kievit TR. 2009. **Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms**. Environ Microbiol. 11(2): 279-88. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x.
- de la Mora J, Uchida K, del Campo AM, Camarena L, Aizawa S & Dreyfus G. 2015. **Structural Characterization of the Fla2 Flagellum of *Rhodobacter sphaeroides***. J Bacteriol. 197(17): 2859-66. doi: 10.1128/JB.00170-15.
- Deacon C & Walsby AE. 1990. **Gas vesicle formation in the dark, and in light of different irradiances, by the cyanobacterium *Microcystis* sp.** British Phycological Journal. 25(2): 133-139. doi: 10.1080/00071619000650121.
- del Campo AM, Ballado T, Camarena L & Dreyfus G. 2011. **In *Rhodobacter sphaeroides*, Chemotactic Operon 1 Regulates Rotation**. J Bacteriol. 193(23): 781-6786. doi: 10.1128/JB.05933-11. doi: 10.1128/jb.179.23.7530-7537.1997.
- del Campo AM, Ballado T, de la Mora J, Poggio S, Camarena L & Dreyfus G. 2007. **Chemotactic Control of the Two Flagellar Systems of *Rhodobacter sphaeroides* Is Mediated by Different Sets of CheY and FlIM Proteins**. J Bacteriol. 189(22): 8397-8401. doi: 10.1128/JB.00730-07
- Domian IJ, Reisenauer A, & Shapiro L. 1999. **Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator**.

PNAS. 96(12): 6648–6653.

- Eddy SR. 1995. **Multiple Alignment Using Hidden Markov Models**. Proc. Third Int. Conf. Intelligent Systems for Molecular Biology, 114-120.
- Entcheva-Dimitrov P & Spormann AM. 2004. **Dynamics and Control of Biofilms of the Oligotrophic Bacterium *Caulobacter crescentus***. J Bacteriol. 186(24): 8254–8266. doi: 10.1128/JB.186.24.8254–8266.2004
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA & Kjelleberg S. 2016. **Biofilms: an emergent form of bacterial life**. Nat Rev Microbiol. 14(9): 563-75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- Francez-Charlot A, Kaczmarczyk A & Vorholt JA. 2015. **The branched CcsA/CckA-ChpT-CtrA phosphorelay of *Sphingomonas melonis* controls motility and biofilm formation**. Molecular Microbiology. 97(1): 47-63. doi:10.1111/mmi.13011.
- Francis N, Poncin K, Fioravanti A, Vassen V, Willemart K, Ong TAP, Rappez L, Letesson JJ, Biondi EG & De Bolle X. 2017. **CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus***. Molecular Microbiology. 103(5): 780–797. doi:10.1111/mmi.13589.
- Gao H, Zhu T, Xu M, Wang S, Xu X, & Kong R. 2016. **pH-dependent gas vesicle formation in *Microcystis***. FEBS Lett. 590(18): 3195-201. doi: 10.1002/1873-3468.12370.
- Gosink JJ, Herwig RP & Staley JT. 1997. ***Octadecabacter arcticus* gen. nov., sp. nov., and *O. antarcticus*, sp. nov., Nonpigmented, Psychrophilic Gas Vacuolate Bacteria from Polar Sea Ice and Water**. System. Appl. Microbiol. 20: 356-365. doi: 10.1016/S0723-2020(97)80003-3.
- Greene S, Brill M, Biondi E & Komeili A. 2012. **Analysis of the CtrA Pathway in *Magnetospirillum* Reveals an Ancestral Role in Motility in Alphaproteobacteria**. J. Bacteriol. 194(11): 2973-2986. doi: 10.1128/JB.00170-12.
- Green HA & Donohue TJ. 2006. **Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHII, a second member of the heat shock sigma factor family**. J Bacteriol. 188(16):5712-21. doi: 10.1128/JB.00405-06.
- Hechler T & Pfeifer F. 2009. **Anaerobiosis inhibits gas vesicle formation in halophilic Archaea**. Mol Microbiol. 71(1):132-45. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06517.x.
- Hernandez-Valle J, Domenzain C, de la Mora J, Poggio S, Dreyfus G & Camarena L. 2017. **The Master Regulators of the Fla1 and Fla2 Flagella of *Rhodobacter sphaeroides* Control the Expression of Their Cognate CheY Proteins**. J Bacteriol. 199(5): e00670–16. doi: 10.1128/JB.00670-16.
- Hofacker A, Schmitz KM, Cichonczyk A, Sartorius-Neef S & Pfeifer F. 2004. **GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum***. Microbiol. 150(6): 1829-38. doi: 10.1099/mic.0.27078-0.
- Hu X, Ritz T, Damjanović A, Autenrieth F & Schulten K. 2002. **Photosynthetic apparatus of purple bacteria**. Q Rev Biophys. 35(1):1-62.

- Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C & Bork P. 2017. **Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper**. *Molecular Biology and Evolution*. 34(8): 2115–2122. doi: 10.1093/molbev/msx148.
- Hwang W, Lee KE, Lee JK, Park BC and Kim KS. 2008. **Genes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 regulated by innate quorum-sensing signal, 7,8-cis-N-(tetradecenoyl) homoserine lactone**. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18(2):219-227.
- Imam S, Noguera DR, & Donohue TJ. 2014. **Global Analysis of Photosynthesis Transcriptional Regulatory Networks**. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004837. doi: 10.1371/journal.pgen.1004837.
- Jäger A, Braatsch S, Haberzettl K, Metz S, Osterloh L, Han Y & Klug G. 2007. **The AppA and PpsR Proteins from *Rhodobacter sphaeroides* Can Establish a Redox-Dependent Signal Chain but Fail To Transmit Blue-Light Signals in Other Bacteria**. *J Bacteriol*. 189(6): 2274–2282. doi: 10.1128/JB.01699-06.
- Kaiser GH, Beck J, Von Schütz JU & Wolf HC. 1981. **Low temperature excitation and emission spectroscopy of the photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas sphaeroides* 'wild-type' strain ATCC 17023**. *Biochimica et Biophysica Acta*. 634: 153-164. doi: 10.1016/0005-2728(81)90135-3.
- Knitsch R, Schneefeld , Weitzel K & Pfeifer F. 2017. **Mutations in the major gas vesicle protein GvpA and impacts on gas vesicle formation in *Haloferax volcanii***. *Mol Microbiol*. 106(4): 530-542. doi: 10.1111/mmi.13833.
- Kromkamp JC & Mur LR. 1984. **Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content**. *FEMS Microbiology Letters* 25(1): 105-109. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb01384.
- Laub MT, Chen SL, Shapiro L & McAdams HH. 2002. **Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle**. *PNAS*. 99: 4632-4637. doi: 10.1073/pnas.062065699.
- Laub MT & Goulian M. 2007. **Specificity in two-component signal transduction pathways**. *Annu Rev Genet*. 41: 121-45. doi: 10.1146/annurev.genet.41.042007.170548.
- Lee EJ, Karoonuthaisiri N, Kim HS, Park JH, Cha CJ, Kao CM & Roe JH. 2005. **A master regulator σ^B governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor***. *Mol Microbiol*. 57(5):1252-64. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04761.x.
- Leung MM, Brimacombe CA & Beatty JT. 2013. **Transcriptional regulation of the *Rhodobacter capsulatus* response regulator CtrA**. *Microbiology (Reading, England)*. 159(1): 96-106. <http://doi.org/10.1099/mic.0.062349-0>.
- Li N & Cannon MC. 1998. **Gas vesicle genes identified in *Bacillus megaterium* and functional expression in *Escherichia coli***. *J Bacteriol*. 180(9):2450-8.
- Li YH & Tian X. 2012. **Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms**. *Sensors (Basel)*. 12(3): 2519-38. doi: 10.3390/s120302519.

- Li N, & Cannon MC. 1998. **Gas Vesicle Genes Identified in *Bacillus megaterium* and Functional Expression in *Escherichia coli*.** J Bacteriol. 180(9): 2450-2458.
- Lori C, Ozaki S, Steiner S, Böhm R, Abel S, Dubey BN, Schirmer T, Hiller S & Jenal U. 2015. **Cyclic di-GMP acts as a cell cycle oscillator to drive chromosome replication.** Nature. 523(7559): 236-9. doi: 10.1038/nature14473.
- Love MI, Huber W & Anders S. 2014. **Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.** Genome Biology. 15(12): 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Mackenzie C, Choudhary M, Larimer FW, Predki PF, Stilwagen S, Armitage JP, Barber RD, Donohue TJ, Hosler JP, Newman JE, Shapleigh JP, Sockett RE, Zeilstra-Ryalls J & Kaplan S. 2001. **The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.** Photosynth Res. 70(1): 19-41. doi: 10.1023/A:1013831823701.
- Mann TH, Childers WS, Blair JA, Eckart MR & Shapiro L. 2016. **A cell cycle kinase with tandem sensory PAS domains integrates cell fate cues.** 7: 11454. doi: dx.doi.org/10.1038/ncomms11454.
- Marczynski GT, Lentine K & Shapiro L. 1998. **A developmentally regulated chromosomal origin of replication uses essential transcription elements.** Genes and Dev. 9: 1543-1557. doi: 10.1101/gad.9.12.1543.
- McEwan AG. 1994. **Photosynthetic Electron-Transport and Anaerobic Metabolism in Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek. 66(1-3): 151-64. doi: 10.1007/BF00871637.
- Mercer RG, Quinlan M, Rose AR, Noll S, JT & Lang AS. 2012. **Regulatory systems controlling motility and gene transfer agent production and release in *Rhodobacter capsulatus*.** FEMS Microbiol Lett. 331(1):53-62. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02553.x.
- Mercer RG, Callister SJ, Lipton MS, Pasa-Tolic L, Strnad H, Paces V, Beatty T & Lang A. 2010. **Loss of the Response Regulator CtrA Causes Pleiotropic Effects on Gene Expression but Does Not Affect Growth Phase Regulation in *Rhodobacter capsulatus*.** J. Bacteriol. 192: 2701-2710. doi: 10.1128/JB.00160-10.
- Mercer RG & Lang AS. 2014. **Identification of a predicted partner-switching system that affects production of the gene transfer agent RcGTA and stationary phase viability in *Rhodobacter capsulatus*.** BMC Microbiology. 14:71. doi: 10.1186/1471-2180-14-71
- Metcalf WW & Wanner BL. 1993. **Construction of new β -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement.** Gene 129:17-25. doi:10.1016/0378-1119(93)90691-U.
- Mignolet J, Panis G & Viollier PH. 2018. **More than a Tad: spatiotemporal control of *Caulobacter pili*.** Current Opinion in Microbiology. 42:79-86. doi: 10.1016/j.mib.2017.10.017
- Moskvin OV, Gomelsky L & Gomelsky M. 2005. **Transcriptome Analysis of the *Rhodobacter sphaeroides* PpsR Regulon: PpsR as a Master Regulator of Photosystem Development.** J Bacteriol. 187(6): 2148-2156. doi: 10.1128/JB.187.6.2148-2156.2005.

- Naylor W, Addelee GA, Gibson LCD and Lucien & Hunter CN. 1999. **The photosynthesis gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides***. *Photosynthesis Research*. 62(2): 121-139. doi: 10.1023/A:1006350405674.
- Nuss AM, Glaeser J, Berghoff BA & Klug G. 2010. **Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides***. *J Bacteriol*. 192(10): 2613-23. doi: 10.1128/JB.01605-09.
- Nuss AM, Glaeser J, Klug G. 2009. **RpoH(II) activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides***. *J Bacteriol*. 191(1):220-30. doi: 10.1128/JB.00925-08.
- O'Gara JP & Kaplan S. 1997. **Evidence for the role of redox carriers in photosynthesis gene expression and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1**. *J Bacteriol*, 179(6):41951-61. doi: 10.1128/jb.179.6.1951-1961.1997.
- Offner S, Hofacker A, Wanner G & Pfeifer F. 2000. **Eight of Fourteen gvp Genes Are Sufficient for Formation of Gas Vesicles in Halophilic Archaea**. *J Bacteriol*. 182 (15): 4328-4336. doi: 10.1128/JB.182.15.4328-4336.2000.
- Oh JI, Ko IJ & Kaplan S. 2003. **Digging deeper: uncovering genetic loci which modulate photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1**. *Microbiol*. 149: 949–960. doi: 10.1099/mic.0.26010-0.
- O'Toole GA. 2011. **Microtiter dish biofilm formation assay**. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 47: 2437. doi:10.3791/2437
- Pfeifer F. 2012. **Distribution, formation and regulation of gas vesicles**. *Nat Rev Microbiol*. 10(10): 705-15. doi: 10.1038/nrmicro2834.
- Pfeifer F. 2015. **Haloarchaea and the Formation of Gas Vesicles**. *Life*. 5(1): 385–402. doi: doi.org/10.3390/life5010385.
- Pini F, De Misco N, Ferri L, Penterman J, Fioravanti A, Brillì M, Mengoni A, Bazzicalupo M, Viollier P, Walker G & Bioindi E. 2015. **Cell Cycle Control by the Master Regulator CtrA in *Sinorhizobium meliloti***. *PLOS Genet*. 11(5): e1005232. doi: 10.1371/journal.pgen.1005232.
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G. & Camarena, L. 2007. **A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides***. *J. Bacteriol*. 189(8):3208-16. doi: 10.1128/JB.01681-06.
- Poggio S, Osorio A, Dreyfus G & Camarena L. 2005. **The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins**. *Mol Microbiol*. 58(4): 969-983. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04900.x.
- Porter SL, Wadhams GH, Martin AC, Byles ED, Lancaster DE & Armitage JP. 2006. **The CheYs of *Rhodobacter sphaeroides***. *J Biol Chem*. 281(43):32694-704. doi: 10.1074/jbc.M606016200

- Porter SL, Wilkinson DA, Byles ED, Wadhams GH, Taylor S, Saunders NJ & Armitage JP. 2011. **Genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N.** J Bacteriol. 193(15):4027-8. doi: 10.1128/JB.05257-11.
- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S & Schaefer AL. 1997. **A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*.** J Bacteriol. 179(23): 7530-7.
- Qian Y & Tabita FR. 1996. **A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides*.** J Bacteriol. 178(1):12-8. doi: 10.1128/jb.178.1.12-18.1996.
- Quandt, J., & M. F. Hynes. 1993. **Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria.** Gene 127: 15-21.
- Quon KC, Yang B, Domian IJ, Shapiro L & Marczyński GT. 1998. **Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin.** Proc Natl Acad Sci U S A. 95(1):120-5. doi: 10.1073/pnas.95.1.120.
- Quon KC, Marczyński GT & Shapiro L. 1996. **Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein.** Cell. 84: 83–93. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80995-2.
- Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML & Baca BE. 2014. **Networks involving quorum sensing, cyclic-di-GMP and nitric oxide on biofilm production in bacteria.** Rev Argent Microbiol. 46(3):242-55. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70079-3.
- Ramsay JP, Williamson NR, Spring DR & Salmond JPC. 2011. **A quorum-sensing molecule acts as a morphogen controlling gas vesicle organelle biogenesis and adaptive flotation in an enterobacterium.** PNAS. 108(36): 14932-14937. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1109169108>.
- Robinson MD, McCarthy DJ & Smyth GK. 2010. **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** Bioinformatics. 26(1): 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Schöbel S, Zellmeier S, Schumann W & Wiegert T. 2004. **The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC.** Mol Microbiol. 52(4):1091-105. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04031.x
- Shukla HD, & DasSarma S. 2004. **Complexity of Gas Vesicle Biogenesis in *Halobacterium sp.* Strain NRC-1: Identification of Five New Proteins.** J Bacteriol. 186(10): 3182–3186. doi: 10.1128/JB.186.10.3182-3186.2004.
- Simon R, Priefer U & Pühler A. 1983. **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria.** Nat Biotechnol. 1:784–791. doi:10.1038/nbt1183-78.
- Smith SC, Joshi KK, Zik JJ, Trinh K, Kamajaya A, Chien P & Ryan KR. 2014. **Cell cycle-dependent adaptor complex for ClpXP-mediated proteolysis directly integrates phosphorylation and second messenger signals.** Proc Natl Acad Sci U S A. 111(39): 14229-34. doi: 10.1073/pnas.1407862111.

- Stoeckenius W & Kunau WH. 1968. **Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes.** The Journal of Cell Biology. 38(2): 337-357. doi: 10.1083/jcb.38.2.337.
- Thanbichler M, Iniesta AA & Shapiro L. 2007. **A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*.** Nucleic acids research, 35(20), e137.
- Tashiro Y, Monson RE, Ramsay JP & Salmond GPC. 2016. **Molecular genetic and physical analysis of gas vesicles in buoyant enterobacteria.** Environmental Microbiology. 18(4): 1264–1276. doi: 10.1111/1462-2920.13203.
- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA & Koonin EV. 2000. **The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution.** Nucleic Acids Research. 28(1): 33-36.
- Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M & van Helden J. 2008. **Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules.** Nat Protoc. 3: 1578-1588. doi: 10.1038/nprot.2008.97.
- Uchino Y & Yokota A. 2003. **"Green-like" and "red-like" RubisCO cbbL genes in *Rhodobacter azotoformans*.** Mol Biol Evol. 20(5): 821-30. doi: 10.1128/JB.00730-07.
- Vega-Baray B, Domenzain C, Rivera A, Alfaro-Lopez R, Gomez-Cesar E, Poggio S, Dreyfus G & Camarena L. 2015. **The flagellar set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the CckA pathway and is repressed by organic acids and the expression of Fla1.** J Bacteriol. 197: 833–847. doi:10.1128/JB.02429-14.
- Vermeiglio A & Joliot P. 1999. **The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*.** Trends Microbiol. 7(11):435-40. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01625-X.
- Wadhams GH & Armitage JP. 2004. **Making sense of it all: bacterial chemotaxis.** Nat Rev Mol Cell Biol. 5(12): 1024-37. doi: 10.1038/nrm1524.
- Walsby AE. 1994. **Gas vesicles.** Microbiol Rev. 58(1): 94-144.
- Wang S. 2012. **Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms, Protein Phosphorylation in Human Health** Cai Huang. IntechOpen. doi: 10.5772/48277.
- Wang H, Ziesche L, Frank O, Michael V, Martin M, Petersen J & Tomasch J. 2014. **The CtrA phosphorelay integrates differentiation and communication in the marine alphaproteobacterium *Dinoroseobacter shibae*.** BMC Genomics. 15(1): 130. doi: 10.1186/1471-2164-15-130.
- West AH & Stock AM. 2001. **Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems.** Trends Biochem Sci. 26(6): 369-76. doi: 10.1016/S0968-0004(01)01852-7.
- Wilkinson DA, Chacko SJ, Vénien-Bryan C, Wadhams GH & Armitage JP. 2011. **Regulation of flagellum number by FliA and FlgM and role in biofilm formation by *Rhodobacter sphaeroides*.** J Bacteriol. 193(15): 4010-4. doi: 10.1128/JB.00349-11.

- Won H, Lee KE, Lee JK, Park BC & Kim KS. 2008. **Genes of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Regulated by Innate Quorum-Sensing Signal, 7,8-cis-N-(Tetradecenoyl) Homoserine Lactone.** J Microbiol Biotechnol. 18(2): 219–227.
- Wu J, Ohta N & Newton A. 1998. **An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*.** PNAS. 95(4): 1443-1448. doi: 10.1073/pnas.95.4.1443.
- Xu BY, Dai YN, Zhou K, Liu YT, Sun Q, Ren YM, Chen Y & Zhou CZ. 2014. **Structure of the gas vesicle protein GvpF from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** Acta Crystallographica Section D. 70(11): 3013-3022. doi: 10.1107/S1399004714021312.
- Yeliseev AA, Eraso JM & Kaplan S. 1996. **Differential carotenoid composition of the B875 and B800–850 photosynthetic antenna complexes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: involvement of spheroidene and spheroidenone in adaptation to changes in light intensity and oxygen availability.** J Bacteriol. 178(20):5877-83. doi: 10.1128/jb.178.20.5877-5883.1996
- Zeng X, Choudhary M & Kaplan S. 2003. **A second and unusual pucBA operon of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: genetics and function of the encoded polypeptides.** J Bacteriol. 185(20):6171-84. doi: 10.1128/JB.185.20.6171-6184.2003
- Zhou B, Schrader JM, Kalogeraki VS, Abeliuk E, Dinh CB, Pham JQ, Cui ZZ, Dill DL, McAdams HH & Shapiro L. 2015. **The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle.** PLoS Genet. 11(1): e1004831. doi: 10.1371/journal.pgen.1004831.