



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“El c-di-GMP y su relación con la producción de alginato en
Azotobacter vinelandii”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. Carlos Leonel Ahumada Manuel

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Cinthia E. Núñez López
Instituto de Biotecnología UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia Rodríguez Almazán
Instituto de Biotecnología UNAM

Dr. Otto Geiger

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2021



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.

COMITÉ TUTOR

¹ Dra. Cinthia E. Núñez López

¹ Dra. Claudia Rodríguez Almazán

² Dr. Otto Geiger

JURADO DE EXAMEN

¹ Dr. José Luis Puente García

¹ Dra. Claudia Martínez Anaya

² Dr. David Salvador Zamorano Sanchez

¹ Dr. Sabino Pacheco Guillen

³ Dr. Dimitris Georgellis

¹ Instituto de Biotecnología (IBt), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

² Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

³ Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Cinthia E. Núñez López.

Durante el desarrollo del presente trabajo recibí financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 298169, así como apoyo de los proyectos PAPIIT-UNAM IN208514 e IN204818, a nombre de la Dra. Cinthia E. Núñez L., para la realización de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cinthia Núñez, por aceptarme en su grupo de trabajo, por ayudarme en todos mis problemas tanto académicos como personales. Sin duda es un excelente ser humano, pero sobre todo excelentísima tutora. Agradezco la confianza depositada en mi, aprendí muchísimo de ella. Me siento muy afortunado de que seamos amigos. Casi es una madre para mí.

A los Drs. Guadalupe Espín y Daniel Segura, gracias por los enriquecedores comentarios en el laboratorio y durante los seminarios de grupo.

A los Drs. Claudia Martínez Almazan y Otto Geiger por sus valiosas contribuciones, comentarios y sugerencias durante los tutorales, los cuales llevaron a una mejora del presente proyecto.

A los miembros del Jurado Revisor; los Drs José Luis Puente, Claudia Martínez Anaya, Sabino Pacheco, David Zamorano Sanchez y Dimitris Georgellis, gracias por el preciado tiempo y el esfuerzo invertido en leer y corregir el presente manuscrito.

A las técnicas académicas del laboratorio Espín-Merino: Biol. María Soledad Moreno León, M. C. Josefina Guzmán Aparicio y M. B. Maria Luisa Tabche Barrera. Gracias por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del presente proyecto, por tener siempre esa gran disponibilidad de enseñar, ayudar y permitir que el laboratorio esté en armonía, pero sobre todo gracias por su sincera amistad.

A doña Jose, mi gran e invaluable amiga Josefina. Muchas gracias por tanto apoyo, tanto dentro como fuera del laboratorio. Es como una madre para mí, hasta me regañaba!! Por eso la quiero mucho, sin duda la voy a extrañar. Dichosos los próximos asesorados por Josefina!! Una de las mejores personas que he conocido en mi vida. Como Jose no hay dos.

Debo agradecer a Toño y Gloria, por su excelente trabajo en la Unidad de Docencia del IBt.

A mi familia. Mi Madre Gloria Manuel Velazquez por sus enormes sacrificios y sabios consejos que me ha dado. A mis hermanos José Miguel, Guadalupe Arisvé y Raquel Azucena por su apoyo y cariño, porque a pesar de la distancia es reconfortante saber que siempre están ahí para darme aliento.

A todos los estudiantes del laboratorio Espín, por ese mutuo aguante que hemos tenido, son muy batallosos (insertando una cantidad exagerada de stickers). Los quiero mucho a todos, Chantal (Chanty), Victor Barrios (El Bicho), Citlalli Gonzaga (La Gonzis), Cristian Camilo (El Rolis), Pablo Olache (El Pablurris), Mariana (Marianita), Juliana Rojo (La Bere), Jessica Ruiz (La Jesiquita), Andrea

Moyao (Andreita), Thalia Barrientos (Thalis Prieto o Sticker Maker), Fernando Loyola (El Fer), Alan David (Elalan) y Karen Amellaly (La karencita). También hay amigos que llegaron y ya se fueron como mi amiga Gabriela Morales (La Gaby), Ricardo Farrera (El Richard), Marcela Martínez (Marce), Holjes que se fue al grupo de mi amiga Johanna Torres (La Parcerita). Al grupo del Dr. Enrique Merino con quienes compartimos laboratorio, comidas, cenas, fiestas, posada navideña, revco cuando se descomponía el de nosotros. A Jose Luis Gama (Pepe) por tener siempre el material listo para su uso y esas charlas de futbol que nos echamos mientras preparábamos soluciones. A doña Francis y doña Mago que nos limpian el material. También todos aquellos que estuvieron en el lab por una estancia corta y que no recuerdo su nombre. Gracias a todos por mantener un muy buen ambiente de trabajo.

A Maritere Uriostegui, mi novia, pero también mi amiga que me ha apoyado en todo momento. Por estar conmigo en las buenas y las muy malas. Gracias por estar ahí siempre, este logro también es tuyo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
1.2 Alginato	2
1.3 Biosíntesis de alginato y su regulación en <i>A. vinelandii</i>	3
1.4 Bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP).....	6
1.4.1 Regulación de EPS por el c-di-GMP	10
2. ANTECEDENTES	15
2.1 En <i>A. vinelandii</i> la proteína señalizadora de membrana interna MucG regula de manera negativa la producción y el PM del alginato.....	15
2.2 La mutante <i>mucG</i> produce alginatos de PM similar bajo diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno.	16
2.3 La mutante <i>mucG</i> mostró niveles elevados de transcripción del gen <i>algD</i>	16
2.4 La función de la DGC MucR no está conservada en <i>A. vinelandii</i> , pero es esencial para formar quistes resistentes a la desecación.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo general	18
4.2 Objetivos particulares	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	19
5.2 Condiciones de cultivo.....	26
5.3 Preinóculos	27
5.4 Preparación de células competentes <i>A. vinelandii</i>	28
5.5 Transformación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	28
5.6 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	28
5.7 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	29
5.8 Manipulación de ácidos nucleicos	29
5.9 Reacción de PCR.....	29
5.10 Digestión de ADN con enzimas de restricción	29
5.11 Reacción de ligación	30

5.12 Construcción de mutantes de <i>A. vinelandii</i>	30
5.13 Ensayo de motilidad	30
5.14 Cuantificación de formación de biopelículas	30
5.15 Cuantificación específica de alginato por el método de Carbazol.....	31
5.16 Determinación del PM del alginato.....	32
5.17 Cuantificación de c-di-GMP por LC-MS/MS.....	32
5.18 Cuantificación de proteína	33
5.19 Búsqueda de motivos de unión de AmrZ y FleQ	33
5.20 Análisis estadísticos	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Identificación de las DGC y PDE putativas en <i>A. vinelandii</i>	35
6.2 El c-di-GMP afecta positivamente la producción y PM de el alginato.....	38
6.3 MucG es un PDE activa y necesita de su dominio GGDEF intacto	39
6.4 La proteína AvGReg (Avin_00420) es la DGC específica que controla la producción de alginato en <i>A. vinelandii</i>	41
6.5 MucG es la única PDE que controla el proceso de biosíntesis de alginato.....	43
6.6 En ausencia de la PDE MucG y la DGC AvGreg, otras DGC activan la síntesis de alginato	44
6.7 La velocidad de transferencia de oxígeno regula el PM del alginato modulando los niveles de c-di-GMP	45
6.8 La cepa silvestre, sobre-productora de alginato, ATCC 9046 tiene altos niveles de c-di-GMP	47
6.9 FleQ y AmrZ son reguladores del proceso de biosíntesis de alginato	48
6.10 Efecto del c-di-GMP en la motilidad tipo nado y formación de biopelículas en <i>A. vinelandii</i>	50
7 DISCUSIÓN	51
7.1 El c-di-GMP regula la formación de biopelículas y motilidad en <i>A. vinelandii</i>	51
7.2 Módulo de control de c-di-GMP que regula el proceso de biosíntesis de alginato.....	51
7.3 El módulo de control responde a oxígeno o estado redox celular	53
7.4 Regulación transcripcional del proceso de biosíntesis de alginato por c-di-GMP.....	57
7.5 El c-di-GMP regula el PM del alginato en <i>A. vinelandii</i>	58
8. CONCLUSION	62
9. PERSPECTIVAS	63
10. REFERENCIAS	64
ANEXO 1	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica del quiste de <i>A. vinelandii</i>	1
Figura 2. Esquema general de la ruta de biosíntesis de alginato.....	4
Figura 3. Representación esquemática del sistema de secreción del alginato.	4
Figura 4. Esquema general de producción y degradación de c-di-GMP.....	8
Figura 5. Ejemplos de algunas señales que regulan la actividad de DGCs y PDEs.....	9
Figura 6. Modelo de activación del complejo PgaCD por el c-di-GMP..	12
Figura 7. Representación esquemática de los sistemas de secreción de los exopolisacáridos alginato, celulosa, celulosa acetilada y PNAG.....	13
Figura 8. Morfología de colonia de la cepa silvestre AEIV y mutante mucG-miniTn5	15
Figura 9. Representación esquemática de los dominios de la proteína MucG de acuerdo con la predicción de dominios con SMART	15
Figura 10. PM de los alginatos producidos por <i>A. vinelandii</i> a la OTR indicada.....	17
Figura 11. Representación esquemática de DGCs y PDEs de <i>A. vinelandii</i>	37
Figura 12. Análisis de secuencia del locus 25190..	37
Figura 13. Alineamientos de la DGC y PDE seleccionadas	38
Figura 14. Efecto de los niveles artificiales de c-di-GMP sobre la producción de alginato en <i>A. vinelandii</i>	39
Figura 15. Cuantificación de c-di-GMP (A) y cuantificación de alginato (B) en las cepas silvestre AEIV, y sus mutantes derivadas Δ mucG, mucG ^{AAA} , Δ mucG/PDE+ y mucG ^{GAAF} y la cepa sobreproductora de alginato ATCC9046.	41
Figura 16. Efecto de las mutaciones en las putativas DGCs y PDEs.....	42
Figura 17. Contexto genómico del gen Avin_00420 que codifica para la DGC AvGReg.	42
Figura 18. Cuantificación de c-di-GMP en las cepas silvestre AEIV y su derivada mutante Δ Avin_00420.....	43
Figura 19. Efecto de las mutaciones dobles Δ mucG y Δ Avin_00420 sobre la producción de alginato.	44
Figura 20. Efecto de la OTR sobre el PM y los niveles de c-di-GMP.	46
Figura 21. Comparación de las cepas AEIV y ATCC 9046.....	48
Figura 22. FleQ y AmrZ son reguladores de la producción de alginato.	49
Figura 23. Efecto de elevados niveles de c-di-GMP sobre la motilidad tipo nado y formación de biopelículas.....	50

Figura 24. Modelo propuesto de regulación del proceso de biosíntesis de alginato por el módulo de control de c-di-GMP identificado en este trabajo..	53
Figura 25. Modelo propuesto para la degradación de RNA dependiente de oxígeno por el degradosoma en <i>E. coli</i>	54
Figura 26. Esquema que muestra la relación de la concentración de oxígeno con la producción de celulosa que depende de los niveles de c-di-GMP.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción específica de alginato y PM de cepas de <i>A. vinelandii</i>	16
Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	19
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	24
Tabla 4 Composición del medio BS	27
Tabla 5. Composición del medio LB	27
Tabla 6. Genes identificados con motivos de unión del regulador AmrZ.	77
Tabla 7. Genes identificados con motivos de unión del regulador FleQ.....	80

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
BS	Burk-Sacarosa
Cb	Cuerpo central
c-di-GMP	Bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico
cm	Centímetro
CM	Medio de competencia
cm ²	Centímetros cuadrados
Da	Dalton
DGC	Diguanilato ciclasas
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EPS	Exopolisacárido
Ex	Exina
fmol	Fentomol
G	ácido α -L-gulurónico
g	Gramos
GDP	Difosfato de guanosina
Gm	Gentamicina
GMP	Monofosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Hora
In	Intina
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
L	Litro
LB	“Lysogeny Broth”
M	Ácido β -D-manurónico
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitro

mmol	milimol
Nal	Ácido nalidíxico
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nM	NanoMolar
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasas
phb	Poli-hidroxi-butilato
PM	Peso Molecular
PNAG	poli- β -1,6-N-acetilglucosamina
qPCR	PCR cuantitativo
rpm	Revoluciones por minuto
Sp	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
V	Volumen
VPS	Polisacárido de <i>Vibrio</i>
μ g	Microgramos
ml	Microlitros

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria de la familia *Pseudomonadaceae* que a pesar de ser aerobia estricta es capaz de fijar nitrógeno mediante un sistema de nitrogenasas sensibles al oxígeno; esto es posible gracias a su alta tasa de respiración, que abate los niveles de oxígeno en la superficie celular. Durante condiciones vegetativas *A. vinelandii* produce el exopolisacárido alginato, un polímero con gran importancia biotecnológica. En bacterias, el segundo mensajero bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) es un regulador positivo de la producción de exopolisacáridos. Las concentraciones de este segundo mensajero son controladas por la actividad de síntesis de las diguanilato ciclasas (DGC), que contiene un dominio GGDEF, y es degradado por las fosfodiesterasas (PDE), de las cuales existen 2 tipos, las que tienen el dominio EAL y las que tienen el dominio HD-GYP. El c-di-GMP promueve la actividad de la alginato polimerasa Alg8-Alg44 en *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, en especies de *Azotobacter* el rol de este segundo mensajero en la producción de alginato no había sido explorado. En este trabajo, encontramos que el c-di-GMP es un regulador positivo, no sólo de la biosíntesis de alginato, sino del peso molecular (PM) del producto sintetizado. Identificamos el módulo de control de c-di-GMP, conformado por las proteínas MucG y AvGReg, que regula el proceso de biosíntesis de alginato. MucG es una proteína multidominio, que contiene dominios GGDEF y EAL conservados y en su extremo N-terminal posee un dominio PAS, que une al cofactor flavin mononucleótido y está involucrado en la detección del estado redox intracelular. MucG es una PDE activa que mantiene los niveles de c-di-GMP bajos, impidiendo la síntesis de cadenas largas de alginato. Por otro lado, AvGReg es la DGC que sintetiza el c-di-GMP necesario para la polimerización de alginato. AvGReg tiene un dominio acoplado de globina (GCS) y se ha demostrado que une oxígeno de manera que estimula su actividad de síntesis de c-di-GMP. La capacidad del c-di-GMP de regular la síntesis de alginato en *A. vinelandii* se analizó en condiciones en las que las pozas de c-di-GMP fueron artificialmente elevadas o abatidas al sobreexpresar la DGC AvGReg o la PDE Avin_50640, respectivamente. Mientras que un aumento de 6 veces en los niveles de c-di-GMP resultó en un incremento de la producción de alginato y de su peso molecular (PM), una reducción de los niveles de c-di-GMP de 17 veces abatió la producción del polímero. Así mismo, nuestros resultados demostraron que la actividad de PDE de MucG previene la síntesis de alginato de alto PM en respuesta a elevadas velocidades de transferencia de oxígeno (OTR), al mantener niveles reducidos de c-di-GMP con respecto a condiciones de baja OTR. Además, encontramos que la sobre producción de la DGC AvGReg inhibe la motilidad tipo nado y promueve la formación de biopelículas, coincidiendo con el esquema general de regulación por c-di-GMP en diversos modelos bacterianos. En conjunto, nuestros resultados indican que el módulo de control por c-di-GMP conformado por la DGC AvGReg y la PDE MucG es el responsable de la regulación de la

producción y PM del alginato. Por otro lado, encontramos que la PDE MucG es la proteína que responde a las distintas OTR, muy probablemente a través de su dominio PAS. La utilización del oxígeno/estado redox como señal para controlar los niveles intracelulares de c-di-GMP tiene implicaciones fisiológicas importantes considerando que *A. vinelandii* es una bacteria diazotrófica pero aerobia estricta. Es posible que este módulo de señalización le permita responder y adaptarse de manera rápida a los distintos ambientes en los que habita esta bacteria.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii belongs to the *Pseudomonadaceae* family and despite of being a strictly aerobic bacterium, is capable of fixing nitrogen through an oxygen-sensitive Nitrogenase system; this is possible thanks to its high respiratory rate that depletes the oxygen over the cell surface. During vegetative conditions, *A. vinelandii* produces the exopolysaccharide alginate, a polymer of biotechnological importance. In bacteria, the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) is a positive regulator for the production of exopolysaccharides. The levels of this second messenger are controlled by the antagonistic activities of diguanylate cyclases (DGC; synthesis), containing a GGDEF domain, and phosphodiesterases (PDE; degradation), containing either EAL or HD-GYP domains. In *Pseudomonas aeruginosa*, the c-di-GMP promotes the activity of the alginate polymerase complex, Alg8-Alg44. However, in *Azotobacter* species the role of this second messenger in alginate production had not been explored. In this work, we found that c-di-GMP is a positive regulator not only for the biosynthesis of alginate but also of its molecular weight (MW). We identified a c-di-GMP control module, composed by the MucG and AvGReg proteins, that regulates the production of alginate. MucG is a composite inner membrane protein, containing conserved GGDEF and EAL domains and the sensory PAS domain at its N-terminal, which binds the flavin mononucleotide and is involved in sensing the intracellular redox state. MucG behaves as a PDE maintaining low c-di-GMP levels preventing the synthesis of long-chains alginates. On the other hand, the DGC AvGReg synthesizes the c-di-GMP necessary for the polymerization of alginate. AvGReg has a globin-coupled sensor (GCS) that upon binding to oxygen stimulates its c-di-GMP synthesis activity. The role of c-di-GMP on alginate synthesis in *A. vinelandii*, was further confirmed by using artificially elevated or reduced pools of c-di-GMP by over-producing the DGC AvGReg or the PDE Avin_50640, respectively. While a 6-fold increase in c-di-GMP levels stimulated the synthesis of alginates of higher MW, a 17-fold decrease in the c-di-GMP levels suppressed alginate production. Likewise, our results demonstrated that the PDE activity of MucG prevents the synthesis of high PM alginate in response to high oxygen transfer rates (OTR), by maintaining reduced levels of c-di-GMP with respect to low OTR conditions. Furthermore, we found that overproduction of the DGC AvGReg inhibits swimming motility and promotes biofilm formation, in agreement with the c-di-GMP overall role in various bacteria genera. Collectively, our results indicate that the c-di-GMP control module formed by the DGC AvGReg and the PDE MucG is responsible for the regulation of alginate production and its PM. On the other hand, we found that the PDE MucG is the protein that responds to different OTR, most likely through its sensory PAS domain. The use of the oxygen/redox state as the signal to modulate the intracellular concentration of c-di-GMP has important physiological implications, considering that *A. vinelandii* is a strict aerobic yet nitrogen fixing

bacterium. It is likely to propose that this signaling module allows the bacterium to readily respond and adapt to its changing environmental habitat.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Vive en el suelo y es una bacteria fijadora de nitrógeno con un metabolismo estrictamente aerobio y de morfología pleomórfica (Segura et al., 2020). Otra característica de esta bacteria es su poliploidía, se ha reportado que *A. vinelandii* llega a poseer hasta 80 copias de su cromosoma. El genoma de la cepa DJ ya ha sido secuenciado, posee 5 365 318 pb y codifica aproximadamente 5051 proteínas (Segura et al., 2020; Setubal et al., 2009).

A. vinelandii puede consumir una gran variedad de fuentes de carbono, incluyendo alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares, mostrando una preferencia por los ácidos orgánicos sobre los carbohidratos. Cuando *A. vinelandii* se encuentra en la fase estacionaria tardía de crecimiento o en condiciones adversas que no favorecen su crecimiento, entra en un proceso de diferenciación, tanto morfológico como fisiológico para producir quistes, que son células latentes resistentes a la desecación (Segura et al., 2020). Estas células diferenciadas están constituidas de un cuerpo central (Cb), que en su interior contiene gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) como polímero de reserva, y está cubierto de dos capas llamadas intina (In) y exina (Ex), que están compuestas por el exopolisacárido (EPS) alginato, lípidos, DNA y proteínas (Segura et al., 2020)(Figura 1).

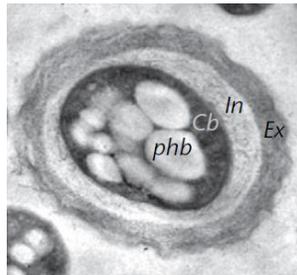


Figura 1. Micrografía electrónica del quiste de *A. vinelandii* (Segura et al., 2020).

Estos dos polímeros, alginato y PHB, también son producidos durante el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii*, y son de gran interés industrial principalmente en el campo biomédico para el desarrollo de dispositivos biocompatibles (Noar and Bruno-Bárcena, 2018). Este hecho convirtió a *A. vinelandii* en un modelo muy atractivo para la producción de alginato y PHB. Además, es posible realizar modificaciones genéticas para hacer más eficiente la producción de estos polímeros (Noar and Bruno-Bárcena, 2018).

1.2 Alginato

Los alginatos son polisacáridos lineales compuestos de proporciones variables de ácido β -D-manurónico (M) unido por un enlace β -1,4 al ácido α -L-gulurónico (G). Se obtienen principalmente de las algas pardas, pero bacterias del género *Pseudomonas* y *Azotobacter* también producen este polímero como un exopolisacárido (Hay et al., 2013; Urtuvia et al., 2017). La principal diferencia que existe entre los alginatos de las algas y los bacterianos radica en la acetilación de los residuos M en las posiciones 2 y 3 (C2 y C3) (Hay et al., 2013). La presencia de dos unidades monoméricas (M y G) en la cadena de alginato permite distintas distribuciones de estos; se ha observado la formación de bloques M, característicos por la presencia de residuos M consecutivos; así como bloques G y bloques MG, con residuos M y G alternados. La presencia de estos bloques, así como el grado de acetilación y el peso molecular (PM) del alginato tienen un fuerte impacto en las propiedades reológicas de las soluciones de alginato (Lee and Mooney, 2012; Urtuvia et al., 2017).

Los alginatos son importantes biopolímeros con aplicaciones en los campos médicos e industriales, donde son usados como agentes estabilizantes, espesantes y agentes gelificantes. Microesferas de alginato han sido utilizadas en la administración terapéutica para la liberación controlada de fármacos, proteínas, vacunas y células (Dhamecha et al., 2019). Actualmente, el alginato es obtenido de las algas pardas. Sin embargo, la composición del polímero varía de acuerdo con las condiciones ambientales limitando su uso en diversos campos, principalmente en el área médica y farmacéutica (Hernández et al., 2010). Debido a esto, *A. vinelandii* ha sido propuesto como una solución para la producción de alginatos con composición definida (Hay et al., 2013; Urtuvia et al., 2017).

En *Pseudomonas aeruginosa* el alginato es importante para la formación de comunidades bacterias que crecen embebidas en una matriz de EPS y adheridos a una superficie inerte o tejido vivo, mejor conocidos como “biopelículas” (o biofilms), proporcionando una gruesa capa protectora contra los ataques de sistema inmune y agentes antimicrobianos (Leid et al., 2005; Lovewell et al., 2014); en *A. vinelandii* el alginato es producido en grandes cantidades durante su crecimiento vegetativo, donde sirve como una barrera contra la difusión de metales pesados así como también para el oxígeno (Sabra et al., 2001). Este polímero es esencial para la perfecta formación del quiste de *Azotobacter*, el cual recubre el cuerpo central proporcionando protección contra las condiciones ambientales adversas (Segura et al., 2020).

1.3 Biosíntesis de alginato y su regulación en *A. vinelandii*

El proceso de biosíntesis de alginato se encuentra muy conservado en *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* (Franklin et al., 2011; Urtuvia et al., 2017). La mayoría de los genes biosintéticos del alginato (*alg*) se encuentran agrupados en una región del cromosoma y son encabezados por *algD*, siendo *algC* el único gen que no se encuentra dentro de esta agrupación de genes. Dentro de los genes *alg* se encuentran genes para la generación del monómero (*algD* y *algA*); para la polimerización y transferencia por la membrana plasmática (*alg8* y *alg44*); para la transferencia por el periplasma y modificación (*algK*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algV* y *algF*) y para la exportación a través de la membrana externa (*algJ*) (Hay et al., 2014).

La síntesis de alginato inicia con la síntesis de fructosa-6-fosfato por gluconeogénesis, que es el sustrato de las enzimas citosólicas fosfomanosa isomerasa/GDP-manosa pirofosforilasa (codificada en *algA*), fosfomanomutasa (codificada en *algC*) y GDP-manosa deshidrogenasa (codificada en *algD*); esta última enzima cataliza una reacción irreversible que produce el monómero activado ácido GDP-manurónico, cuyo único destino es ser el sustrato del complejo polimerasa Alg8-Alg44 (Figura 2). Esta reacción de oxidación catalizada por AlgD (GDP-manosa deshidrogenasa), es la reacción limitante clave del proceso de biosíntesis de alginato (Hay et al., 2013; Urtuvia et al., 2017). A continuación, el ácido GDP-manurónico es polimerizado por el complejo de membrana interna Alg8-Alg44. Alg8 es la glicosiltransferasa tipo-2 y Alg44 una proteína multidominio, con un dominio citosólico PilZ, una región transmembranal y un dominio periplásmico que interacciona físicamente con las demás proteínas que forman parte del andamiaje periplásmico, facilitando el tránsito, modificación y secreción del alginato (Figura 3) (Hay et al., 2013; Moradali et al., 2015). La cadena nascente de alginato (poli M) pasa a través del periplasma por el andamiaje periplásmico formado por las proteínas AlgG, AlgX, AlgK y la región periplásmica de Alg44, que guían el alginato desde el complejo polimerasa de membrana interna hacia la porina de membrana externa AlgJ (Hay et al., 2013; Moradali et al., 2015). Durante este trayecto, la cadena de alginato es acetilada en sus residuos M, donde el grupo acetilo es transferido por el complejo acetiltransferasa formado por AlgI, AlgF, AlgV y AlgX; siendo esta última la encargada de acetilar directamente el residuo de M en la cadena de alginato (Hay et al., 2013; Moradali et al., 2015). Además, los residuos M que no están acetilados pueden ser epimerizados a residuos G por la epimerasa AlgG. Sin embargo, se ha demostrado que en *A. vinelandii* la epimerasa AlgG tiene una contribución casi nula a la epimerización de residuos M a G y son una familia de C5 epimerasas extracelulares denominadas AlgE1-AlgE7 las encargadas de modificar al alginato una vez que este ha sido secretado de la célula (Gimmestad et al., 2006; Hoidal

et al., 2000; Urtuvia et al., 2017). Por último, el alginato es secretado al medio extracelular por la porina AlgJ (Hay et al., 2013; Urtuvia et al., 2017). (Figura 3).

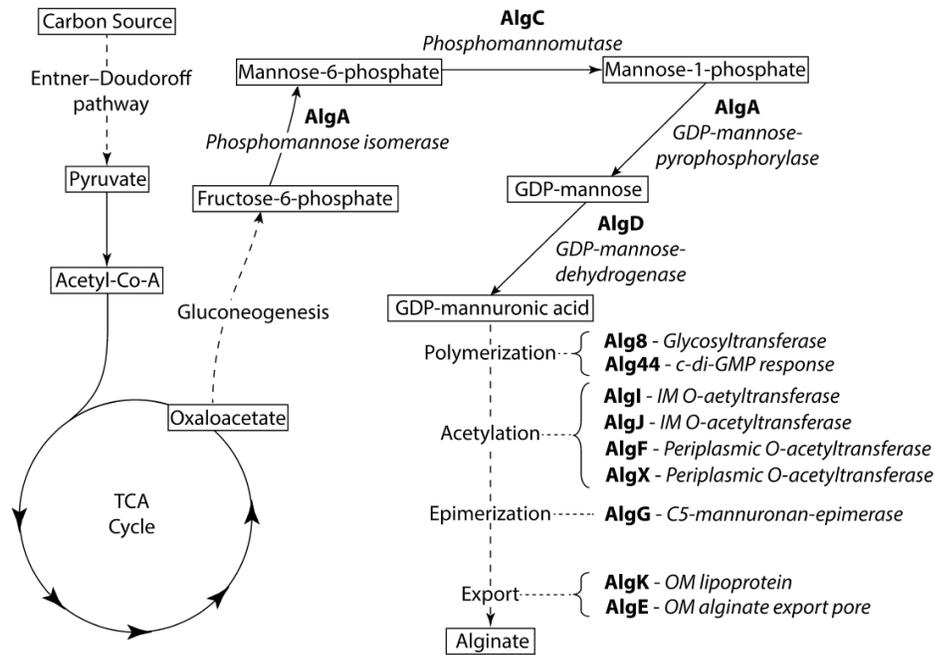


Figura 2. Esquema general de la ruta de biosíntesis de alginato(Hay et al., 2013).

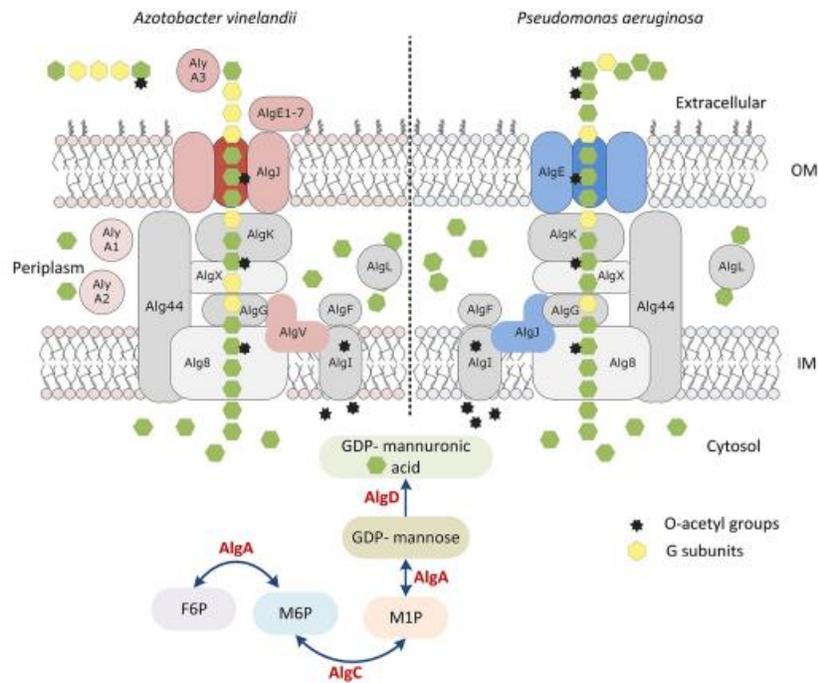


Figura 3. Representación esquemática del sistema de secreción del alginato (Urtuvia et al., 2017). Aún cuando estos dos procesos se encuentran conservados, como se menciona en el texto, existen algunas diferencias entre las que se encuentran la familia de C5 epimerasas en *A. vinelandii* que sustituyen el papel de AlgG para la introducción de residuos Gulurónicos en el alginato secretado.

Dentro del grupo de genes *alg* también se encuentra el gen *algL* que codifica para una alginato liasa, cuya actividad es la de degradar la cadena de alginato. Se ha propuesto que la enzima AlgL contribuye a la estabilidad del andamiaje periplásmico y se encarga de degradar las cadenas de alginato que erróneamente no alcanzan a ser secretadas por la porina de membrana externa (Bakkevig et al., 2005; Hay et al., 2013). Además de AlgL, *A. vinelandii* codifica para 5 alginato liasas, AlyA1, AlyA2, AlyA3, AlyB y AlgE7, esta última es una enzima con actividad dual liasa/epimerasa y pertenece a la familia de C5 epimerasas extracelulares mencionadas anteriormente (Urtuvia et al., 2017).

A pesar de que la mayoría de los genes estructurales involucrados en la síntesis de alginato comparten un alto grado de identidad entre *Pseudomonas spp.* y *A. vinelandii* la regulación sí posee marcadas diferencias. Dado que el gen *algD* codifica la enzima clave en la ruta de biosíntesis del alginato, su expresión esta finamente controlada, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En *A. vinelandii*, el gen *algD* es el blanco de varios reguladores, como el factor sigma de estrés AlgU (σ^E), el de fase estacionaria RpoS (σ^S) y el sistema de dos componentes que regula metabolismo secundario GacS/GacA (Castañeda et al., 2000; Núñez et al., 2000). El efecto de GacS/GacA esta mediado por el sistema de regulación post-transcripcional RsmA/RsmZY. RsmA es una proteína que se une directamente al mRNA de *algD* evitando su traducción. GacA activa la transcripción de una familia de pequeños RNAs reguladores (RsmZ1-7 y Remy), que antagonizan la actividad de RsmA mediante la titulación de esta proteína permitiendo la traducción del mRNA de *algD* (Hernandez-Eligio et al., 2012; Manzo et al., 2011). De manera interesante, en *P. aeruginosa* no se ha reportado que el Sistema Gac/Rsm-RpoS regule la biosíntesis de alginato (Hay et al., 2014)

Por otra parte, AlgU es esencial para la producción de alginato, pues es necesario para la expresión de los genes *alg* y *algC*. Al igual que en *E. coli*, la actividad del factor sigma AlgU es antagonizada por los factores anti-sigmas MucA y MucB (Martínez-Salazar et al., 1996). De esta manera, los niveles de producción de alginato se abaten en una mutante *algU*, mientras que en una mutante *mucAB*, se incrementan, al elevarse la transcripción de *algD* (Moreno et al., 1998; Núñez et al., 2000). El operon *algUmucABCD* se encuentra conservado en *P. aeruginosa* y es necesario para la producción de alginato en esta bacteria pues el operón biosintético *alg* encabezado por *algD* esta bajo el control del factor sigma AlgU. Sin embargo, y a diferencia de *A. vinelandii*, la acumulación de alginato sólo se ve favorecida en aislados clínicos que portan mutaciones que inactivan al gen *mucA*, aumentando la actividad de AlgU y con ello la expresión de los genes biosintéticos *alg* (Hay et al., 2014).

Además de estos reguladores transcripcionales y post-transcripcionales (como es el caso de RsmA), otros reguladores transcripcionales han sido estudiados en *P. aeruginosa*. Tal es el caso de AlgR, AlgB y AmrZ (inicialmente llamado AlgZ), que son reguladores positivos directos de *algD* (Jones et al., 2014; Kong et al., 2015; Leech et al., 2008; Ma et al., 1998; Xu et al., 2016). Por otro lado, en *A. vinelandii* AlgR no afecta la transcripción de *algD* y se reportó como un regulador esencial para la formación de quistes resistentes a desecación (Núñez et al., 1999). Para el caso de AlgB, en un estudio reciente realizado por Mærk y colaboradores encontraron que una mutación en el gen *algB* no afectaba la producción de alginato, contrastando fuertemente con su papel en *P. aeruginosa* (Leech et al., 2008; Mærk et al., 2020). En este mismo estudio, elaborado por Mærk se encontró que el regulador AmrZ (Alginate and Motility Regulator) sí es necesario para el proceso de producción de alginato, dado que una mutante *amrZ* abate la producción del polímero, sugiriendo que la función de AmrZ con respecto a la producción de alginato se encuentra conservada entre *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* (Mærk et al., 2020).

Por último, se ha descrito una regulación a nivel post-traduccional del proceso de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* por el segundo mensajero bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) (Hay et al., 2009; Whitney et al., 2015).

1.4 Bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP)

El bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico, c-di-GMP, es un segundo mensajero utilizado por las bacterias para convertir estímulos ambientales en una respuesta celular. Se han reportado una gran variedad de fenotipos afectados por el c-di-GMP, dentro los que destacan la transición de células motiles a células sésiles dentro de un biofilm, la motilidad tipo swimming y tipo swarming, la producción de adhesinas, EPS, factores de virulencia, la regulación del ciclo celular en *Caulobacter crescentus*, el desarrollo o diferenciación celular, entre otros (Ha and O'Toole, 2015; Hengge, 2016; Jenal et al., 2017; Römling et al., 2013).

Los niveles de este segundo mensajero son contralados a través de su síntesis y su degradación (Hengge, 2009). El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por las diguanilato ciclasas (DGC), que se caracterizan por poseer la secuencia conservada de aminoácidos GGDEF, razón por la cual se conocen también como dominios GGDEF. Estos dominios funcionan en forma de dímeros de tal manera que cada dímero proporciona una molécula de GTP (Römling et al., 2013; Schirmer, 2016). Algunas DGCs están sujetas a una inhibición no competitiva por producto,

el sitio de unión de c-di-GMP se llama sitio I (I-site, en inglés) que tiene un motivo conservado con la secuencia de aminoácidos RxxD (Römling et al., 2013; Schirmer, 2016). Por otro lado, el c-di-GMP es degradado por las fosfodiesterasas (PDE) de las cuales existen dos tipos, las EAL y las HD-GYP que también reciben esos nombres por ser los aminoácidos más conservados en el dominio, además de ser aminoácidos esenciales para la realización de la catálisis. El dominio EAL convierte el c-di-GMP en GMP dimérico lineal (5'pGpG) y al igual que los dominios GGDEF funcionan en forma de homodímero (Römling et al., 2013; Sundriyal et al., 2014). Por su parte, las PDEs tipo HD-GYP degradan el c-di-GMP a dos moléculas de GMP (Bellini et al., 2014), que fácilmente puede ser convertido a GTP. De este hecho se originó la interrogante de qué pasaba con el producto pGpG de las PDE tipo EAL en las células. Respondiendo a esta pregunta, se reportó a la proteína Orn como la oligorribonucleasa que convertía el pGpG en GMP, asimismo se demostró que el pGpG es un inhibidor competitivo de la actividad PDE de los dominios EAL (Cohen et al., 2015; Orr et al., 2015) (Figura 4).

La secuenciación de genomas ha permitido identificar los genes involucrados en la síntesis y degradación de c-di-GMP en la mayoría de los *phyla* bacterianos. Encontrando bacterias que solo poseen un dominio GGDEF como *Campilobacter jejuni* hasta algunas especies como *Vibrio vulnificus* que tienen 92 DGC/PDE. Por otro lado, se encuentran aquellas que solo poseen DGC y PDE tipo HD-GYP, ejemplos *Treponema pallidum* y *Thermotoga maritima* (Amikam and Galperin, 2006; Römling et al., 2013). Este hecho, fue el que sugirió que los dominios HD-GYP podían funcionar también como PDE de c-di-GMP, además de encontrar proteínas con ambos dominios fusionados GGDEF-HDGYP (Römling et al., 2013; Ryan et al., 2006). También se encontraron muy frecuentemente proteínas fusionadas tipo GGDEF-EAL surgiendo la pregunta de cuál es la actividad que prevalece en este tipo de proteínas híbridas. Se han reportado varios casos de proteínas fusionadas en las cuales uno de los dos dominios no es funcional, debido a la no conservación de los residuos catalíticos (Christen et al., 2005) y aquellas donde ambos dominios se encuentran conservados y ambos poseen actividad catalítica (Österberg et al., 2013; Tarutina et al., 2006), sugiriendo algún tipo de regulación para que una actividad enzimática prevalezca sobre la otra. Esta búsqueda bioinformática de las DGC y PDE permitió identificar que en el extremo N-terminal de estos dominios GGDEF y EAL se encuentran dominios sensores como los dominios PAS, REC, GAF, etc. que podrían integrar señales detectadas a través de ellos a los mecanismos de señalización de c-di-GMP (Figura 5) (Dahlstrom and O'Toole, 2017; Jenal et al., 2017).

Para ejercer su efecto o transmitir el mensaje, el c-di-GMP debe unirse a sus efectores, que se encargan de desencadenar la respuesta celular. Hasta la fecha se han descrito una gran cantidad de

efectores dentro los que destacan los dominios PilZ, factores transcripcionales, dominios EAL degenerados, el sitio de inhibición de dominios GGDEF degenerados, riboswitches, entre otros (Chou and Galperin, 2016) (Figura 4).

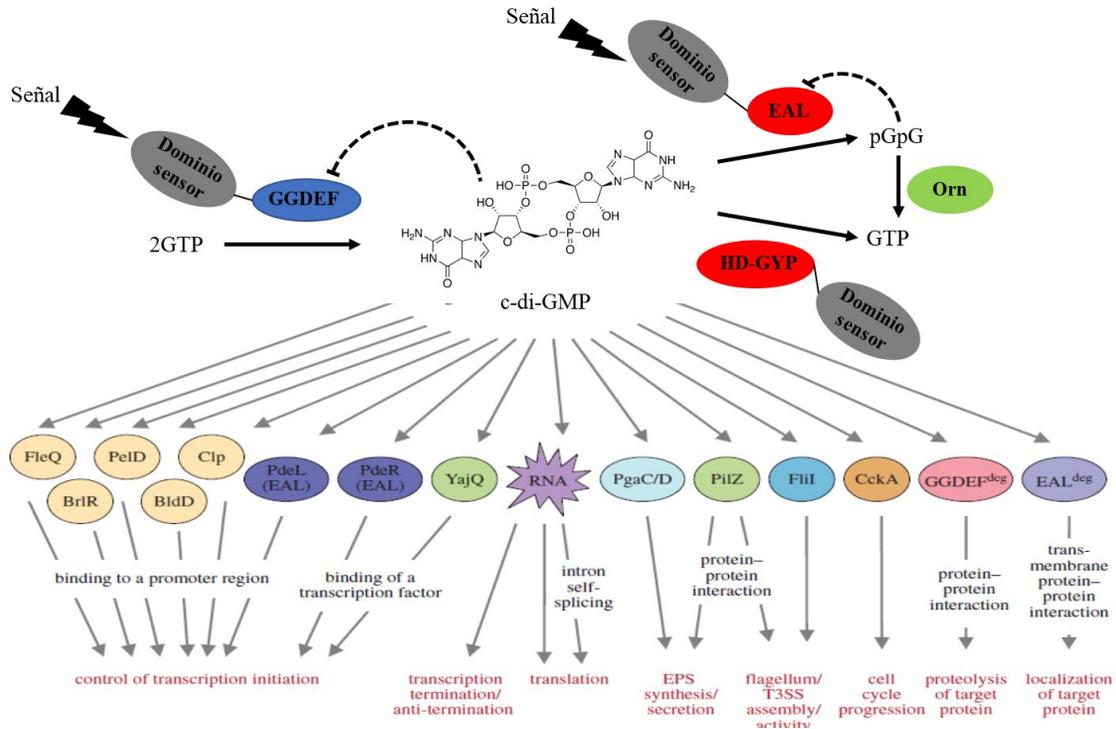


Figura 4. Esquema general de producción y degradación de c-di-GMP. DGCs con dominios GGDEF en azul, PDEs que contiene dominios EAL o HD-GYP en rojo y oligoribonucleasa (Orn) en verde. Además, se muestran una diversidad de efectores que unen al segundo mensajero, así como el proceso fisiológico blanco de la señalización de c-di-GMP (Hengge, 2016). Se muestran factores transcripcionales FleQ, PelD, Clp, BriR y BldD cuya unión del c-di-GMP modula su interacción con las regiones promotoras de sus genes blanco, las PDE triggers PdeL y PdeR, YajQ y dominios PilZ que son pequeños dominios o forman parte de proteínas mas grandes y sirven como adaptadores entre el c-di-GMP y sus proteínas blancos. El complejo de membrana PgaCD descrito en la Figura 6. Riboswitches que se encuentran en la región 5' UTR de los RNAs mensajero y pueden estructurarse de manera diferente cuando unen el c-di-GMP controlando la transcripción del gen o la traducción del RNA mensajero. FliI es una proteína que forma parte del cuerpo basal del flagelo cuya actividad ATPasa es controlada por la unión del c-di-GMP; los dominios GGDEF y EAL degenerados son también ampliamente reconocidos como proteínas efectoras de c-di-GMP. (Modificado de (Hengge, 2016)).

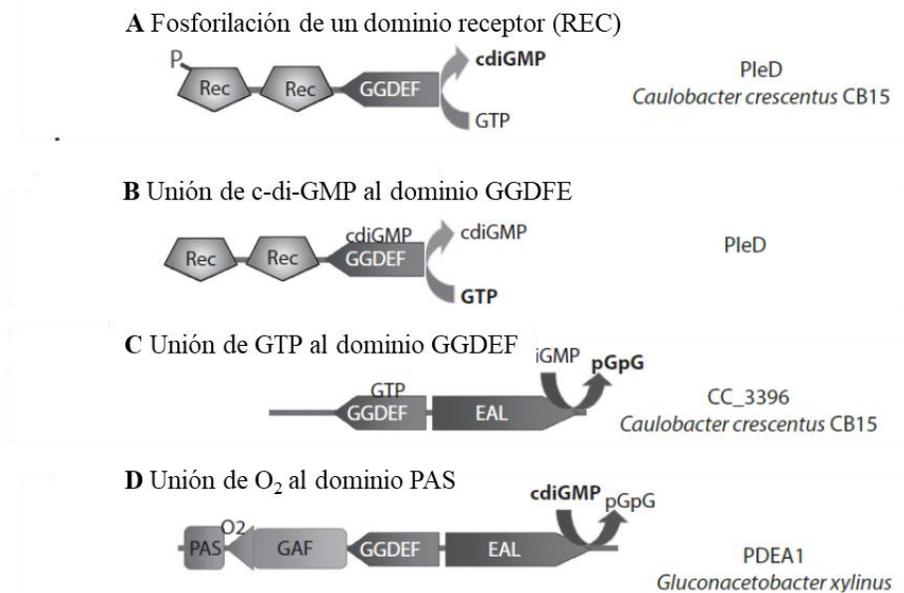


Figura 5. Ejemplos de algunas señales que regulan la actividad de DGCs y PDEs. **A** La fosforilación de uno de los dominios REC de PleD promueve la activación del dominio GGDEF. **B** La unión del c-di-GMP al sitio de inhibición inactiva los dominios GGDEF. **C** La unión de GTP al dominio GGDEF de la proteína CC_3396 de *C. crescentus* promueve la actividad de hidrólisis del dominio EAL. **D** La unión del oxígeno al dominio PAS inhibe al dominio EAL de la PDEA1 de *G. xylinus*. Modificado de (Römling and Simm, 2009)

Se ha definido que el módulo de control de c-di-GMP está compuesto de al menos una DGC, una PDE, un efector y una molécula/estructura blanco. Debido a que existe una gran cantidad de genes que codifican para DGCs y PDEs en los genomas bacterianos, se ha propuesto que estos módulos de control de c-di-GMP funcionan en microcompartimentos interactuando entre ellos impidiendo la difusión del c-di-GMP y que otros efectores detecten al segundo mensajero inespecíficamente (Hengge, 2009). La existencia de pozas localizadas y compartimentalizadas de c-di-GMP se apoya en evidencia de que mutaciones individuales de genes que codifican para DGC y PDE no afectan todos los procesos fisiológicos regulados por el c-di-GMP, sugiriendo que no todas las DGCs o PDEs se encuentran presentes o activas; y deben estar sujetas a una regulación que les permite ser específicas de determinado proceso. Se ha propuesto que los módulos de control de c-di-GMP están sujetos a un secuestro temporal o funcional. Por secuestro temporal se entiende que los niveles de las proteínas (DGCs y/o PDEs) así como sus actividades cambian en respuesta a una señal ambiental o durante la fase de crecimiento. En *E. coli* se ha demostrado que los niveles de c-di-GMP durante la fase de crecimiento post-exponencial son bajos debido a la presencia de la PDE PdeH que se encuentra bajo regulación indirecta del regulador del flagelo FlhDC, favoreciéndose la motilidad. Pero en fase estacionaria de crecimiento la expresión de la PDE PdeH disminuye y el factor sigma $rpoS$ (σ^s) favorece la expresión de las DGCs DgcE y DgcQ, cuya actividad de síntesis aumenta los niveles de c-di-GMP inhibiendo la motilidad tipo de nado. Por otro lado, el secuestro funcional se

refiere a que dos o mas módulos de control estan activos dentro de la célula, pero estos estarían funcionando separados físicamente generando niveles de c-di-GMP de manera localizada afectando a procesos celulares distintos. Un ejemplo de niveles localizados de c-di-GMP se encuentra en *E. coli*, durante la transición de la fase de crecimiento post-exponencial a fase estacionaria el módulo de control formado por la DGC DgcE y PDE PdeH controla la motilidad y tiene un pequeño efecto sobre la transcripción del regulador *csgD*, pero en fase estacionaria y bajo regulación transcripcional de RpoS, el módulo de control formado por las DGC DgcM y la PDE PdeR modulan exclusivamente la expresión de *csgD*, sugiriendo que este módulo (DgcM-PdeR) actúa de manera localizada afectando solo la transcripción de *csgD*. Otra evidencia que apoya la formación de microcompartimentos es la interacción directa de las proteínas que integran el modulo de control como es el caso de la DGC HmsT, la PDE HsmP y la glicosiltransferasa HsmR y una proteína accesoria HsmS, todas ellas requeridas para la producción de exopolisacárido en *Yersinia pestis*.

Desde su descubrimiento como un regulador alostérico de la celulosa sintasa en *Gluconoacetobacter xilinus* (Morgan et al., 2014; Ross et al., 1987), el campo del c-di-GMP ha sido ampliamente estudiado hasta la fecha. El c-di-GMP está involucrado con muchos procesos pero la formación de biofilm, un proceso potenciado por altos niveles de c-di-GMP, se encuentra entre los más estudiados (Ha and O'Toole, 2015). Uno de los componentes principales de un biofilm maduro es el EPS y varios reportes revelan que c-di-GMP regula la producción de EPS (Ha and O'Toole, 2015; Pérez-Mendoza and Sanjuán, 2016).

1.4.1 Regulación de EPS por el c-di-GMP

La regulación de la producción de EPS por c-di-GMP se ha observado en dos niveles, a nivel transcripcional del operón biosintético del EPS y a nivel post-traducciona como un activador de la maquinaria de polimerización (Pérez-Mendoza and Sanjuán, 2016). Dos EPS que son muy conocidos por ser regulados por el c-di-GMP son los producidos por *P. aeruginosa*, llamado polisacárido Pel y el polisacárido de *Vibrio* (VPS). Estos son dos ejemplos en los que se conoce el factor de transcripción que responde a c-di-GMP. VpsT posee un dominio de unión al ADN HTH (hélice-vuelta-hélice; Helix-Turn-Helix, por sus siglas en inglés) y un dominio REC no canónico con una hélice adicional (hélice $\alpha 6$), esta $\alpha 6$ une dos moléculas c-di-GMP intercaladas que dan como resultado un dímero de VpsT que es capaz de unirse específicamente a la región reguladora del operón biosintético *vps-II* y actuar como un antirepresor desplazando a la proteína H-NS (Ayala et al., 2015; Krasteva et al., 2010; Zamorano-Sánchez et al., 2015). Por otro lado, FleQ pertenece a la familia de los reguladores NtrC

conocidos como proteínas enhancer de unión bacterianas (bacterial enhancer binding protein, bEBP). Este regulador está compuesto de un dominio REC, un dominio AAA+ ATPasa, que se puede subdividir en subdominios SD1 y SD2, y un dominio de unión a DNA. FleQ a diferencia de las bEBP canónicas no necesita ser fosforilado en su dominio REC para adquirir una estructura cuaternaria hexamérica en forma de anillo y de manera espontánea puede formar el hexámero en solución. Es esta forma hexamérica de FleQ la que actúa como un represor de la transcripción del operon *pel*, uniéndose a dos sitios en el promotor llamados box1 y box2. FleQ une un dímero intercalado de c-di-GMP en una región entre sus subdominios SD1 y SD2 ocasionando un rearrreglo en su estructura cuaternaria, cambiando de un hexámero a un dímero-de-trímeros que posee afinidad por solo el sitio box1 convirtiéndose en un activador de la expresión del operon *pel* (Matsuyama et al., 2016). Los sitios de unión a c-di-GMP en estos reguladores transcripcionales son diferentes entre sí y con el dominio PilZ, que fue el primer dominio efector caracterizado, esto hace patente que el mecanismo de detección de c-di-GMP en los efectores es variable.

La regulación a nivel post-traducciona l de la producción de celulosa por el c-di-GMP fue el primer proceso en describirse. Brevemente, la síntesis de celulosa es activada por la unión de c-di-GMP al dominio PilZ del extremo C-terminal de la proteína BcsA, la glicosiltransferasa tipo-2 responsable de la polimerización de celulosa, induciendo un cambio conformacional del estado desactivado al estado activado. El estado desactivado o autoinhibido se caracteriza por la presencia de un puente salino que estabiliza un bucle de puerta (gating loop) que bloquea el acceso del sustrato al sitio activo de la BcsA sintasa, mientras que la unión del c-di-GMP aleja al bucle de puerta del sitio activo permitiendo el acceso del sustrato (Morgan et al., 2014). Mientras la síntesis de celulosa es estimulada a través de un dominio PilZ perteneciente a la glicosiltransferasa, existen otros EPSs cuyo proceso de polimerización es estimulado por la unión de c-di-GMP al sitio de inhibición (I-site) de un dominio GGDEF degenerado. Este es el caso para los EPSs de *Listeria*, conocidos como Listeria EPSs, y de nueva cuenta el polisacárido Pel de *P. aeruginosa*. El mecanismo molecular que afecta la actividad de la glicosiltransferasa en respuesta a la unión del c-di-GMP permanece sin resolverse; sin embargo se sabe que mutantes carentes de estos dominios efectores, aun en condiciones de altos niveles de c-di-GMP, son incapaces de sintetizar el EPS (Chen et al., 2014; Köseoğlu et al., 2015; Lee et al., 2007). Además, de los dominios PilZ y los dominios GGDEF degenerados, otro mecanismo de activación de una sintasa de EPS fue descrito para la síntesis de poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (PNAG) en *Escherichia coli*. En este proceso, el efector del c-di-GMP es el complejo proteico formado por PgaCD. PgaC es una glicosiltransferasa de tipo-2 y PgaD es una proteína de función desconocida, pero se ha sugerido que ayuda a la actividad de PgaC debido a que una mutante en *pgaD*

no sintetiza el polímero. La unión del c-di-GMP a las proteínas PgaCD estabiliza la interacción proteína-proteína (PgaC-PgaD) y activa la síntesis de PNAG. Por otro lado, cuando el c-di-GMP está ausente la interacción proteína-proteína es débil y la proteína PgaD es rápidamente degradada (Figura 6) (Steiner et al., 2013)

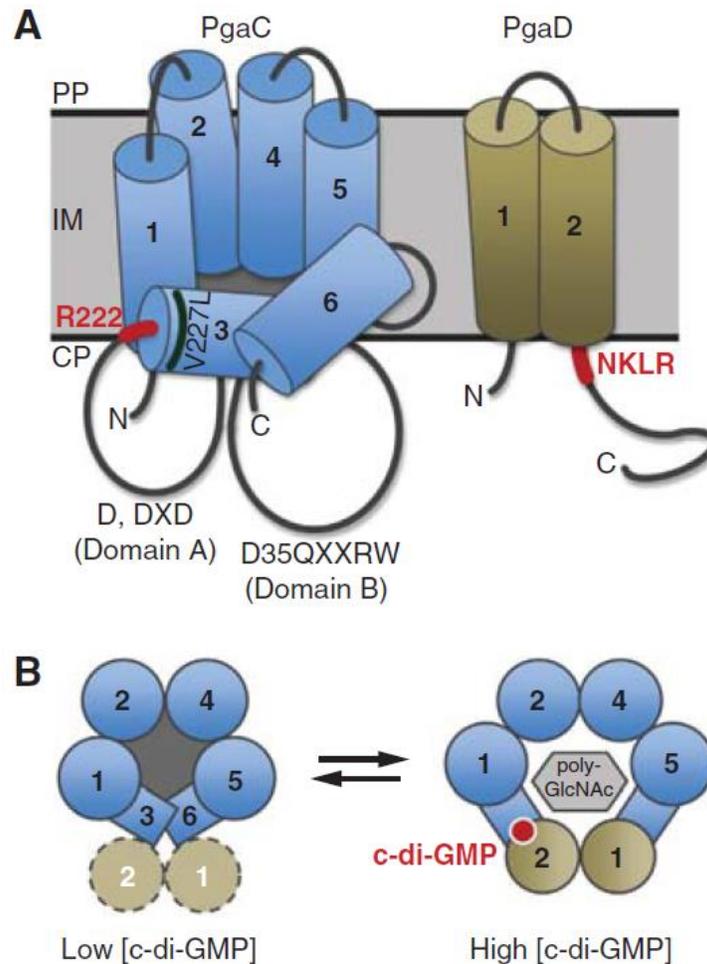


Figura 6. Modelo de activación del complejo PgaCD por el c-di-GMP. A Modelo topológico de las proteínas PgaC y PgaD en la membrana interna. PgaC contiene 4 dominios transmembranales (1, 2, 4 y 5) y 2 dominios asociados a membrana (3 y 6). En rojo se marcan los aminoácidos involucrados en la unión del c-di-GMP. B Vista superior del complejo PgaCD. La unión del c-di-GMP al complejo PgaCD, marcada en rojo, estabiliza el heterodímero e induce una conformación activa capaz de sintetizar el polímero (derecha). Cuando no se une c-di-GMP el complejo PgaCD es inactivo, posee una asociación débil y la proteína PgaD es muy inestable (izquierda) (Steiner et al., 2013).

Los procesos de biosíntesis de celulosa, celulosa acetilada, PNAG y alginato han sido clasificados por Whitney y Howell dentro de los sistemas de secreción de exopolisacárido dependientes de sintasa en bacterias Gram-negativas, donde han identificado los componentes conservados claves de este proceso de biosíntesis: una polimerasa embebida en la membrana interna, un sistema de andamiaje periplásmico y una porina en la membrana externa; diferenciándose de los

sistemas de secreción Wzx/Wzy y transportadores ABC, que utilizan una molécula lipídica como aceptor para iniciar la síntesis del polisacárido y utilizan proteínas similares para la exportación del polímero, proteínas de las familias de exportación de polisacáridos de membrana externa (OPX) y polisacárido copolimerasa (PCP) (Whitney and Howell, 2013). Otra característica compartida por estos sistemas que dependen de un sintasa es la regulación a nivel post-traducciona por el segundo mensajero, c-di-GMP (Figura 7) (Whitney and Howell, 2013).

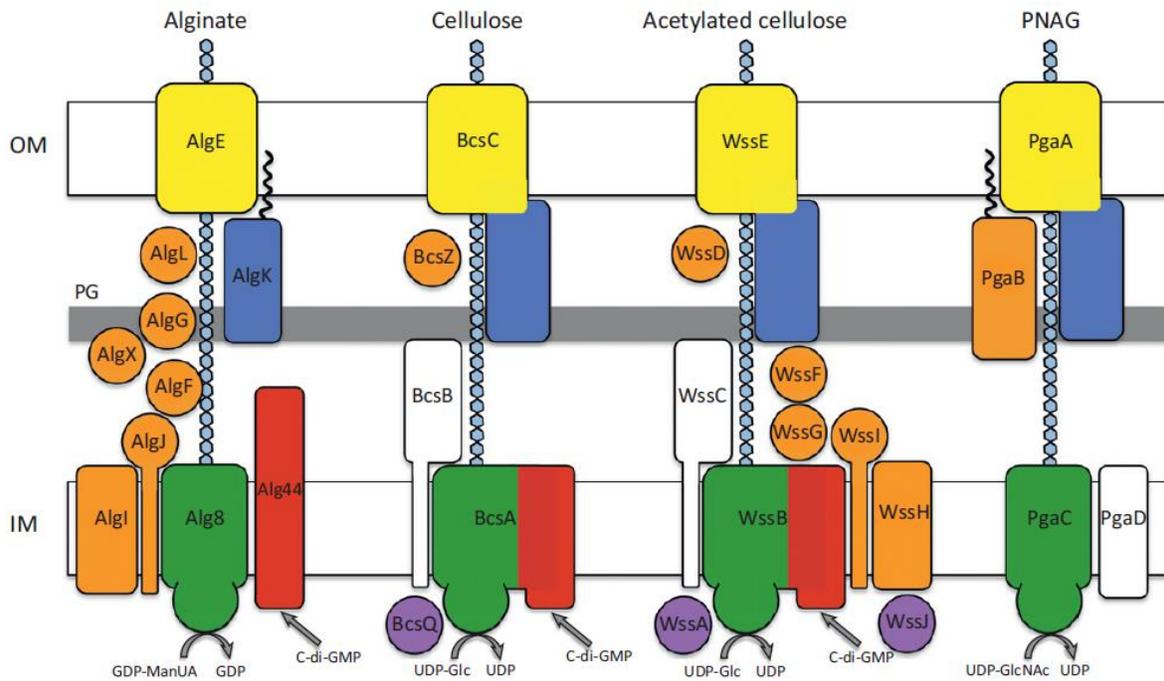


Figura 7. Representación esquemática de los sistemas de secreción de los exopolisacáridos alginato, celulosa, celulosa acetilada y PNAG. Se ilustran los componentes conservados de estos sistemas, en verde la glicosiltransferasa, en rojo la proteína o dominio que une al c-di-GMP, en azul la proteína de andamiaje periplásmico que posee un motivo de tetracopeptido repetido (TPR), en amarillo la porina de membrana externa, en naranja proteínas encargadas de modificar al polímero y en blanco proteínas con función todavía desconocida (Whitney and Howell, 2013). Poco tiempo después de la publicación del artículo de Whitney y Howell, se publicó el trabajo de Steiner *et al.* 2013 de donde se demostró que el polímero PNAG también es regulado por el c-di-GMP a nivel postraducciona.

Para el caso particular del proceso de biosíntesis de alginato, la presencia del dominio PilZ en Alg44 sugirió que este proceso podría estar regulado por el c-di-GMP. Se demostró que efectivamente, este dominio PilZ de Alg44 es esencial para unir c-di-GMP y producir alginato en *P. aeruginosa* (Merighi *et al.*, 2007). Se demostró que los aminoácidos R21, D44, R17 y R95 del dominio PilZ de Alg44 son esenciales para unir un dímero de c-di-GMP y así estimular la síntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Whitney *et al.*, 2015). Por otro lado, se reportó a la proteína MucR como la DGC que sintetiza el c-di-GMP en las cercanías del dominio PilZ de Alg44 para la activación de este proceso (Hay *et al.*, 2009). Sin embargo, por medio de estudios de mutagénesis sitio dirigida se concluyó que la activación del complejo Alg8-Alg44 difiere del mecanismo propuesto para la

activación de la celulosa sintasa (Moradali et al., 2017, 2015); hasta el momento se desconoce el mecanismo estructural de activación de la alginato polimerasa por c-di-GMP.

2. ANTECEDENTES

2.1 En *A. vinelandii* la proteína señalizadora de membrana interna MucG regula de manera negativa la producción y el PM del alginato.

Estudios previos en nuestro laboratorio lograron establecer que el gen Avin_07910 de *A. vinelandii* ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de alginato y su PM. El gen Avin_07910 codifica una proteína a la que hemos llamado MucG (de mucoidía; una mutante *mucG* es más mucoide que la cepa parental como se puede apreciar en la Figura 8). Un análisis de MucG reveló que se trata de una proteína multidominio de membrana interna que posee tanto un dominio GGDEF para la síntesis de c-di-GMP, así como un dominio EAL, para la degradación de este segundo mensajero en el extremo carboxilo terminal. Ambos dominios están muy conservados y poseen los residuos involucrados en la catálisis, que sugiere que podrían ser funcionales. Así mismo, MucG posee un dominio PAS involucrado en la detección de oxígeno o estado redox (Figura 9).

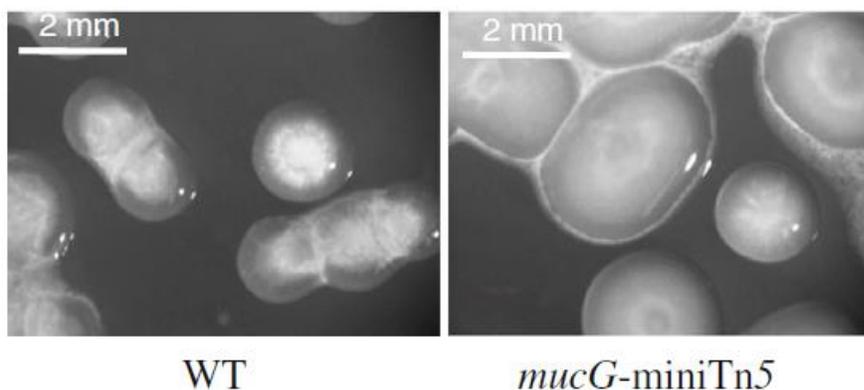


Figura 8. Morfología de colonia de la cepa silvestre AEIV y mutante *mucG*-miniTn5 (Ahumada-Manuel et al., 2017)



Figura 9. Representación esquemática de los dominios de la proteína MucG de acuerdo con la predicción de dominios con SMART, (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

La caracterización de mutantes *mucG*⁻ estableció que MucG ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de alginato y su PM (Tabla 1). Así mismo, variantes de MucG en donde se mutaron aminoácidos potencialmente involucrados en la catálisis por el dominio PDE (es decir en la degradación del c-di-GMP) (MucG^{AAA}) fenocopió a la mutante *mucG*. Esto nos sugiere que el dominio de PDE de MucG es esencial para el efecto negativo que tiene esta proteína sobre la

producción de alginato y su PM (Tabla 1) (Ahumada-Manuel et al., 2017), sugiriendo que la proteína MucG actúa como una PDE.

Tabla 1. Producción específica de alginato y PM de cepas de *A. vinelandii*

Cepa	Genotipo	Alginato ^a	PM (kDa)
AEIV	Silvestre	1560 ± 18	527 ± 19
GG9	<i>mucG</i> -miniTn5	2800 ± 187	1,112 ± 134
MucG ^{AAA}	<i>mucG</i> ^{AAA} Sp ^r	3027 ± 217	1,106 ± 85

^aµg de alginato/mg de proteína

2.2 La mutante *mucG* produce alginatos de PM similar bajo diferentes condiciones de velocidad de transferencia de oxígeno.

En la literatura se encuentran algunos reportes donde se demuestra que el PM del alginato producido por *A. vinelandii* es modulado por la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) (Díaz-Barrera et al., 2007; Lozano et al., 2011). Se determinó que a OTR inferiores a 7 mmol L⁻¹ h⁻¹ se puede obtener alginato de mayor PM y cuando las OTR son mayores a 7 mmol L⁻¹ h⁻¹ el PM parece ser independiente de la OTR (Flores et al., 2014). Nosotros determinamos que la proteína MucG es necesaria para el control del PM del alginato en respuesta a la OTR. El PM del alginato producido por la cepa silvestre aumentó de 600 kDa a 1000 kDa al disminuir la OTR de 5.24 mmol L⁻¹ h⁻¹ a 2.56 mmol L⁻¹ h⁻¹; esto no sucede en la cepa GG9 (mutante Δ *mucG*), donde el PM del alginato es mayor a 1100 kDa, independientemente de la OTR utilizada (Figura 10). Especulamos que el incremento en PM en bajas OTRs, pudiera estar dado por una disminución en la abundancia de MucG o en su actividad catalítica. Es probable que el dominio PAS de MucG module las actividades de los dominios de DGC o PDE en respuesta al oxígeno (Ahumada-Manuel et al., 2017).

2.3 La mutante *mucG* mostró niveles elevados de transcripción del gen *algD*

El gen *algD*, que lidera los genes *alg*, codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa la enzima clave del proceso de biosíntesis de alginato. Resultados de fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ*, así como ensayos de qRT-PCR demostraron que la ausencia de MucG deriva en un aumento de 3 veces en la expresión del gen *algD*, con respecto a la cepa silvestre. Hasta el momento, desconocemos el mecanismo por el cual MucG ejerce este efecto sobre la expresión de *algD* y si está

o no mediado por una alteración en las pozas intracelulares de c-di-GMP (Ahumada-Manuel et al., 2017).

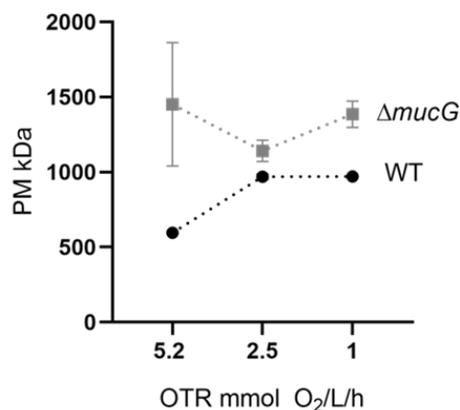


Figura 10. PM de los alginatos producidos por *A. vinelandii* a la OTR indicada. Gráfico elaborado con los datos presentados en Ahumada *et. al.* 2017 (Ahumada-Manuel et al., 2017).

2.4 La función de la DGC MucR no está conservada en *A. vinelandii*, pero es esencial para formar quistes resistentes a la desecación.

A. vinelandii codifica para un ortólogo de la DGC MucR (Avin_49140), que posee un 73% de identidad con la DGC MucR de *P. aeruginosa* y dada la cercanía filogenética entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* se esperaba que desempeñara el mismo papel en *A. vinelandii*. Sin embargo, estudios en nuestro laboratorio demostraron que el ortólogo de MucR en *A. vinelandii* no es el responsable de proveer la pozas de c-di-GMP para la síntesis de alginato pues la síntesis de este polisacárido no se afectó en una mutante *mucR* (Martínez Ortiz, 2015). Sin embargo, MucR es responsable de proveer las pozas necesarias de c-di-GMP para el proceso de diferenciación celular, ya que los quistes de una mutante Δ *mucR* no resisten la desecación. Se mostró que los quistes de la mutante Δ *mucR* no contienen las capas de alginato que lo recubren, aún cuando la producción de alginato se encuentra a niveles silvestres tanto en condiciones vegetativas y en enquistamiento. Se comprobó que la ausencia de las capas de alginato se debe a la ausencia de las AlgeE1-7 epimerasas, que se encargan de la modificación del alginato por medio de la introducción de bloques ricos en residuos G permitiendo así la correcta estructuración de las capas de alginato que recubren el quiste. Este resultado sugiere que en *A. vinelandii* el papel de MucR es reemplazado por alguna otra DGC codificada en el genoma de *A. vinelandii*.

3. HIPÓTESIS

En *A. vinelandii*, el módulo de control formado por la PDE MucG y una DGC distinta a MucR regulan la producción de alginato y su PM controlando los niveles de c-di-GMP en respuesta a diferentes condiciones de oxígeno.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el módulo de control por c-di-GMP que regula la producción de alginato y su PM en condiciones de crecimiento vegetativo.

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar el efecto de distintos niveles de c-di-GMP en la producción de alginato y su PM.
- 2.- Demostrar que MucG es una PDE activa que forma parte del módulo de control por c-di-GMP que regula el proceso de biosíntesis de alginato.
- 3.- Identificar la(s) DGC(s) que pertenecen al módulo de control por c-di-GMP que regula el proceso de biosíntesis de alginato.
4. Determinar si diferentes condiciones de OTR modulan los niveles de c-di-GMP controlando el PM del alginato.
- 5.- Investigar si los reguladores FleQ y AmrZ regulan la síntesis de alginato.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Genotipo/Características Relevantes	Referencia
cepas		
AEIV (E)	Cepa tipo silvestre. Nal ^r	(Larsen and Haug, 1971)
ATCC 9046	Cepa tipo silvestre. Nal ^r	Colección ATCC
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1D (lacZYA-argF U169 [φ80dlacZDM15] F- Nal^r)</i>	(Hanahan, 1983)
CLAM04	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>mucG</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Sp (Δ <i>mucG</i> ::Sp). Sp ^r	Este trabajo
CLAM05	Derivada de la CLAM04 que porta el gen <i>Avin_50640</i> bajo el control del promotor σ^{70} . Sp ^r Tc ^r	Este trabajo
CLAM01	Derivada de la AEIV que porta el alelo de <i>mucG</i> con el dominio EAL inactivo (<i>mucG^{AAA}</i>). Sp ^r	(Ahumada-Manuel et al., 2017)
CLAM06	Derivada de la AEIV que porta el alelo de <i>mucG</i> con el dominio GGDEF inactivo (<i>mucG^{GGAAF}</i>). Sp ^r	Este trabajo
CLAM07	Derivada de la AEIV que porta el gen <i>Avin_00420</i> bajo el control del promotor σ^{70} . Tc ^r	Este trabajo
ICM01	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_49140</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm (Δ <i>mucR</i> ::Gm). Gm ^r	(Martínez-Ortiz et al., 2020)
CLAM08	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_00370</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM09	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_00530</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Km ^r . Km ^r	Este trabajo
CLAM10	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_04950</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Km ^r . Km ^r	Este trabajo
CLAM11	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_05790</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM12	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_28640</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM13	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_37830</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM14	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_38420</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Km ^r . Km ^r	Este trabajo
CLAM15	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_39460</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM16	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_44470</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM17	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_00420</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo
CLAM18	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_08240</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm ^r . Gm ^r	Este trabajo

CLAM19	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_11600</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM20	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_22780</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM21A	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_25190</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM21B	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_25191</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM22	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_29300</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Km^r . Km^r	Este trabajo
CLAM23	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_33420</i> fue inactivado por inserción de un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM24	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_48220</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM25	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_48930</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM26	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_49060</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM27	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_51660</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Km^r . Km^r	Este trabajo
CLAM28	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_34930</i> fue inactivado por inserción de un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM29	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_25160</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
CLAM30	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>Avin_50640</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
JGAT255	Derivada de ATCC 9046 en donde el gen <i>Avin_00420</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm^r . Gm^r	Este trabajo
AED- <i>gusA</i>	Derivada de la AEIV que porta una fusión transcripcional, <i>algD-gusA</i> , en el <i>locus</i> de <i>algD</i> . Gm^r	(Quiroz-Rocha et al., 2017)
CLAM31	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>amrZ</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Gm (<i>amrZ</i>). Gm^r .	Este trabajo
CLAM32	Derivada de la AEIV en donde el gen <i>FleQ</i> fue parcialmente eliminado y reemplazado por un casete de Sp (<i>FleQ</i>). Sp^r	Este trabajo
CLAM33	Derivada de la CLAM04 en donde el gen <i>Avin_00420</i> fue eliminado y reemplazado por un casete de Gm . Gm^r	Este trabajo
CLAM34	Complementación de la cepa CLAM17, en donde el gen <i>Avin_00420</i> y su región reguladora fueron reintegrados en el cromosoma de <i>A. vinelandii</i> . Sp^r Tc^r	Este trabajo
CLAM35	Derivada de la AEIV que porta el gen <i>Avin_50640</i> bajo el control del promotor σ^{70} . Tc^r	Este trabajo

Plasmids

pJET1.2/Blunt	Usado para subclonar productos de PCR. Ap^r	Thermo Scientific
pHP45 Ω	Fuente del casete Ω Sp^r	(Fellay et al., 1987)
pBSL98	Fuente del casete Gm^r	(Alexeyev et al., 1995)
pBSL141	Fuente del casete Km^r	(Alexeyev et al., 1995)
pUMATc	Plásmido usado para la integración del DNA dentro del <i>locus melA</i> de <i>A. vinelandii</i> . Tc^r	(Cocotl-Yañez et al., 2014)

pJG09	Derivado del pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 3.2 kb que contiene el gen <i>mucG</i> y su región regulatoria. Ap ^r	(Ahumada-Manuel et al., 2017)
pLA05	Derivado de pJG09 en el cual el gen <i>mucG</i> fue deletado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Sp clonado en un sitio BamHI artificialmente generado. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para la construcción de la mutante CLAM04 (Δ <i>mucG</i> ::Sp).	Este trabajo
pLA06	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1439 pb que contiene la porción N-terminal del alelo <i>mucG</i> ^{GGAAF} .	Este trabajo
pJG103	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta el locus <i>mucG</i> entero y un casete de Sp inmediatamente río abajo como un marcador de selección.	(Ahumada-Manuel et al., 2017)
pLA06-Sp	Derivado de pJG103 que porta el alelo mutado <i>mucG</i> ^{GGAAF} . El fragmento <i>XhoI</i> , silvestre y de 4.3 kb fue reemplazado por el fragmento <i>XhoI</i> del plásmido pLA06 que contiene las mutaciones D452A y E453A. Ap ^r , Sp ^r . Este plásmido se digirió con <i>ScaI</i> y se utilizó para la construcción de la mutante CLAM06.	Este trabajo
pLA07	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 275 pb que contiene el promotor σ^{70} y el codón ATG del casete de Gm. Ap ^r	Este trabajo
pLA08	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1463 pb que contiene la secuencia codificante del gen Avin_00420 excepto su codón ATG de inicio de la traducción. Ap ^r	Este trabajo
pLA09	Derivado de pLA07 que porta el gen Avin_00420 bajo el control de un promotor σ^{70} (P σ^{70} -Avin_00420). Ap ^r . El gen Avin_00420 fue clonado como un fragmento <i>BamHI-XbaI</i> obtenido del plásmido pLA08.	Este trabajo
pLA10	Derivado de pUMA Tc que porta la construcción P σ^{70} -Avin_00420 del plásmido pLA09, obtenida como un fragmento <i>Bg/II</i> . Ap ^r , Tc ^r . Este plásmido digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la cepa CLAM07.	Este trabajo
pLA11	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1106 pb que contiene el gen Avin_50640, excepto su codón ATG de inicio de la traducción. Ap ^r	Este trabajo
pLA12	Derivado de pLA07 que porta la construcción P σ^{70} -Avin_50640. El gen Avin_50640 fue clonado como un fragmento <i>BamHI-XbaI</i> obtenido del plásmido pLA11. Ap ^r	Este trabajo
pLA13	Derivado de pUMA Tc que porta la construcción P σ^{70} -Avin_50640 del plásmido pLA12, obtenida como un fragmento <i>Bg/II</i> . Ap ^r , Tc ^r . Este plásmido digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la cepa CLAM05 y CLAM35.	Este trabajo
pLA14	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2523 pb que contiene el ORF Avin_00370	Este trabajo
pLA15	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2789 pb que contiene el ORF Avin_00530	Este trabajo
pLA16	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1662 pb que contiene el ORF Avin_04950	Este trabajo
pLA17	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2909 pb que contiene el ORF Avin_05790	Este trabajo
pLA18	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 3481 pb que contiene el ORF Avin_28640	Este trabajo
pLA19	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2917 pb que contiene el ORF Avin_37830	Este trabajo
pLA20	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1990 pb que contiene el ORF Avin_38420	Este trabajo

pLA21	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2333 pb que contiene el ORF Avin_39460	Este trabajo
pLA22	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2418 pb que contiene el ORF Avin_44470	Este trabajo
pLA23	Derivado de pLA14, en donde el gen Avin_00370 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM08.	Este trabajo
pLA24	Derivado de pLA15, en donde el gen Avin_00530 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Km clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM09.	Este trabajo
pLA25	Derivado de pLA16, en donde el gen Avin_04950 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Km clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM10.	Este trabajo
pLA26	Derivado de pLA17, en donde el gen Avin_05790 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM11.	Este trabajo
pLA27	Derivado de pLA18, en donde el gen Avin_28640 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM12.	Este trabajo
pLA28	Derivado de pLA19, en donde el gen Avin_37830 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM13.	Este trabajo
pLA29	Derivado de pLA20, en donde el gen Avin_38420 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Km clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM14.	Este trabajo
pLA30	Derivado de pLA21, en donde el gen Avin_39460 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM15.	Este trabajo
pLA31	Derivado de pLA22, en donde el gen Avin_44470 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM16.	Este trabajo
pLA32	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2338 pb que contiene el ORF Avin_00420. Ap ^f .	Este trabajo
pLA33	Derivado de pLA32, en donde el gen Avin_00420 fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM17 y CLAM33.	Este trabajo
pLA34	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2307 pb que contiene el ORF Avin_08240. Ap ^f	Este trabajo
pLA35	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2307 pb que contiene el ORF Avin_11600. Ap ^f	Este trabajo
pLA36	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1808 pb que contiene el ORF Avin_22780. Ap ^f	Este trabajo
pLA37	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 4683 pb que contiene los ORFs Avin_25190 and Avin_25191. Ap ^f	Este trabajo

pLA38A	Derivado de pLA37, en donde el gen <i>Avin_25190</i> fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM21A.	Este trabajo
pLA38B	Derivado de pLA37 en donde el fragmento <i>XhoI-StuI</i> de 2531 pb fue eliminado.	Este trabajo
pLA38C	Derivado de pLA38B, en donde el gen <i>Avin_25191</i> fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM21B.	Este trabajo
pLA39	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2033 pb que contiene el ORF <i>Avin_29300</i>	Este trabajo
pLA40	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1109 pb que contiene el ORF <i>Avin_33420</i>	Este trabajo
pLA41	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1946 pb que contiene el ORF <i>Avin_48220</i>	Este trabajo
pLA42	Derivado de pLA41, en donde el gen <i>Avin_48220</i> fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizada para construir la mutante CLAM24.	Este trabajo
pLA43	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1783 pb que contiene el ORF <i>Avin_48930</i>	Este trabajo
pLA44	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2633 pb que contiene el ORF <i>Avin_49060</i>	Este trabajo
pLA45	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2740 pb que contiene el ORF <i>Avin_51660</i>	Este trabajo
pLA46	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 769 pb que contiene el ORF <i>Avin_34930</i>	Este trabajo
pLA47	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2083 pb que contiene el ORF <i>Avin_25160</i>	Este trabajo
pLA48	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2038 pb que contiene el ORF <i>Avin_50640</i>	Este trabajo
pLA49	Derivado de pLA34, en donde el gen <i>Avin_08240</i> fue eliminado por PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM18.	Este trabajo
pLA50	Derivado de pLA35, en donde el gen <i>Avin_11600</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>SphI</i> de 1643 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM19.	Este trabajo
pLA51	Derivado de pLA36, en donde el gen <i>Avin_22780</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>SaII-StuI</i> de 1047 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM20.	Este trabajo
pLA52	Derivado de pLA39, en donde el gen <i>Avin_29300</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>EcoRV-SphI</i> de 732 pb fue reemplazado por un casete de Km. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM22.	Este trabajo
pLA53	Derivado de pLA40, en donde el gen <i>Avin_33420</i> fue inactivado por inserción de un casete de Gm en un sitio de restricción <i>BglII</i> . Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> , fue utilizado para construir la mutante CLAM23.	Este trabajo
pLA54	Derivado de pLA43, en donde el gen <i>Avin_48930</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>ApaI-SphI</i> de 954 pb fue reemplazado por un	Este trabajo

	casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM25.	
pLA55	Derivado de pLA44, en donde el gen <i>Avin_49060</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>StuI-SphI</i> de 1510 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM26.	Este trabajo
pLA56	Derivado de pLA45, en donde el gen <i>Avin_51660</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>EcoRI</i> de 924 pb fue reemplazado por un casete de Km. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM27.	Este trabajo
pLA57	Derivado de pLA46, en donde el gen <i>Avin_34930</i> fue inactivado. Un sitio de restricción <i>EcoRV</i> fue utilizado para introducir el casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM28.	Este trabajo
pLA58	Derivado de pLA47, en donde el gen <i>Avin_25160</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>EcoRI-NdeI</i> de 3449 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM29.	Este trabajo
pLA59	Derivado de pLA48, en donde el gen <i>Avin_50640</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>SmaI</i> de 120 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM30.	Este trabajo
pJGAT420	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2338 pb que contiene el ORF <i>Avin_00420</i> . Ap ^r	Este trabajo
pJGAT420-Gm	Derivado de pJGAT420, en donde el gen <i>Avin_00420</i> fue eliminado por un PCR inverso y reemplazado por un casete de Gm clonado en un sitio <i>BamHI</i> generado artificialmente. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante JGAT255.	Este trabajo
pLA60	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 1098 pb que contiene el gen <i>AmrZ</i> . Ap ^r	Este trabajo
pLA61	Derivado de pLA60, en donde el gen <i>amrZ</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>SacI</i> de 96 pb fue reemplazado por un casete de Gm. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM31.	Este trabajo
pLA62	Derivado de pJET1.2/Blunt que porta un fragmento de 2362 pb que contiene el gen <i>fleQ</i> . Ap ^r	Este trabajo
pLA63	Derivado de pLA62, en donde el gen <i>fleQ</i> fue parcialmente eliminado. Un fragmento <i>SphI-EcoRV</i> de 1229 pb fue reemplazado por un casete de Sp. Este plásmido previamente digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la mutante CLAM32.	Este trabajo
pLA64	Derivado de pUMA Tc que porta el gen <i>Avin_00420</i> del plásmido pLA32, obtenida como un fragmento <i>BglIII</i> . Ap ^r , Tc ^r . Este plásmido digerido con <i>ScaI</i> fue utilizado para construir la cepa CLAM34.	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Templado	Utilizado para...
xseB1AhBm-F	GGACCGTTCGTCGGATCCAGGG TCTGCCGGCGTTC	pJG09	Eliminación de <i>mucG</i> por PCR inverso
mucGD-R	TGGATCCTCGGCTCAGCATTGGG GTC		
GG9-RT-F	CAACCGCCACTATCTGGTC CCAGCAGCAGGAGGAACGCGGCG	pJG09	Amplificación de un fragmento de 224 pb con la mutación deseada (GAC → GCC and GAA → GCG) para construir la variante <i>mucG^{GGAAF}</i>
GGDEF(GGAAF)-R	CCGCCGGAGCGGCCACCAGC		

mucG-R	GATTGCTCGAAATCGACGGCG	pJG09	amplificación por “overlapping” PCR del alelo mucG ^{GGA^{AF}} usando el fragmento de 224 pb. El producto de 1439 pb fue clonado produciendo el plásmido pLA06
pGm-F	TTTGCCCATGGACGCACAC	pSRK-Gm	Amplificación de la región promotora del casete de Gm contenido en el plásmido pLA07
pGmBh1-R2	AGGATCCCATCGTTGCTGCTCCAT AAC		
00420Bh1-F	TGGATCCTCTATGCCCGGTATCTC CC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_00420 contenido en el plásmido pLA08
00420-R	CAGAACGGGTGATCCACATCCC		
50640Bh1-F	TAGGATCCAAAGCCACCATCCTC GTCGTGG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_50640 contenido en el plásmido pLA11
50640-R	CATGTGGGCGCAGATCAAGG		
00370-F	CATCACGGCATGGTGATCG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_00370 contenido en el plásmido pLA14
00370-R	CGGATTGGAACCGGATGTG		
avin00370-FD	CGGATCCAACTCTCGCCTACCG	pLA14	Eliminación de Avin_00370 por PCR inverso
avin00370-RD2	TAGGGTCTCTGGGTAAGTG		
avin00530-F	CGGCCTTGTTGGTGAAAGTC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_00530 contenido en el plásmido pLA15
avin00530-R	GGCTATTGCTGTCCGAACG		
avin00530-RD	GGGATCCGTCCAATTGACGCATC CAG	pLA15	Eliminación de Avin_00530 por PCR inverso
avin00530-FD	GCGACGAGATCCAGGGTTAC		
Avin04950-F	GACATGGCACTTGCATGAC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_04950 contenido en el plásmido pLA16
Avin0490-R	AATAGGCGTACCGCTCGTC		
Avin_04950-RD	AGGATCCAGCAGTTTGAGGCGAT GGTG	pLA16	Eliminación de Avin_04950 por PCR inverso
Avin_04950-FD	ACGAGGATGCCGAGCAGTTG		
Avin05790-F	CTTCCAGGGCACCTATGTCTG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_05790 contenido en el plásmido pLA17
Avin05790-R	TCGAATACCTGGCGGACAAG		
Avin05790-RD	CGAATCCTTCGGGACCGTTG	pLA17	Eliminación de Avin_05790 por PCR inverso
Avin05790-FD	TGGATCCTCAGCGCTCTGACCGA ACAG		
28640-F	GCCGTCCAATCGACTAAAC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_28640 contenido en el plásmido pLA18
28640-R	GGCAGGTAGAGAAGGTTCC		
28640-RD	TTCCGCATGTCAGGCACCAC	pLA18	Eliminación de Avin_28640 por PCR inverso
28640-FD	AGGATCCCTGCTCGAGTTCTCCAC AAG		
37830-F	CGGTTCTTCGACAAGTTC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_37830 contenido en el plásmido pLA19
37830-R	CACCTCGCTCTGCATGTAG		
37830-RD	AGGATCCACAGCAGTCCGAGCAG AAG	pLA19	Eliminación de Avin_37830 por PCR inverso
37830-FD	TCCGCACCATCATCCAGTTG		
Avin38420-F	TGTCGTCTACACTCATGGTG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_38420 contenido en el plásmido pLA20
Avin_38420-R	GTACACGGCCAACCACTTTC		
Avin38420-RD	CATGACGAACCGCTGCAGCAACA G	pLA20	Eliminación de Avin_38420 por PCR inverso
Avin38420-FD	TGGATCCCTCTCCAGCGAGCCAA GCACAA		
39460-F	GTCATTGCGGGCTGCAAG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_39460 contenido en el plásmido pLA21
39460-R	CTCGTCGGTGACGAACAAGG		
39460-RD	CCCGGCATGGAAATGGAAC	pLA21	Eliminación de Avin_39460 por PCR inverso
39460-FD	AGGATCCAGCGATCAGGCACTGT ACC		
Avin44470-F	ACGGGATTCTGGCCTATC	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_44470 contenido en el plásmido pLA22
Avin44470-R	CTGCGTATCACTGGCATTAC		
Avin44470-RD	TGGATCCGAACTGTACAGGTAGG CGATCAC	pLA22	Eliminación de Avin_44470 por PCR inverso
Avin44470-FD	AAGGCCTGCTACCGGATCTTC		
00420-F	ACAGGATCTGTCACTTG	DNA cromosomal	Amplificación de Avin_00420 contenido en el plásmido pLA32
00420-R2	ATCCAGTTGCTCGACATCC		
00420-RD	TCC ATT CTG CGG CCT GTT G	pLA32	Eliminación de Avin_00420 por PCR inverso
00420-FD	ACG GAT CCA CCT GCA ACT GAC CGT GAG		

08240-F	AACTGCGCCTGTTGTTTC	DNA	Amplificación de Avin_08240 contenido en el plásmido pLA34
08240-R	CGGTGGAATACCGCATAG	cromosomal	
11600-F	GGCCAAGCTGGAATCCATC	DNA	Amplificación de Avin_11600 contenido en el plásmido pLA35
11600-R	ATCGAGCTTGCCGAGGTTG	cromosomal	
22780-F	CCCATGGCTACACCTACTC	DNA	Amplificación de Avin_22780 contenido en el plásmido pLA36
22780-R2	TCTTCCAGTCCGGTATG	cromosomal	
25190-F	TCCCGAATTGGACAAAGC	DNA	Amplificación de Avin_25190 and Avin_25191 contenido en el plásmido pLA37
25190-R	CCAACCTCGCGACAGTTTC	cromosomal	
25190-RD	CATGCAGCGGAATCACAG		
25190(A)-FD	ACGGATCCTCTTGGAGGGCTGTCTG TAG	pLA37	Eliminación de Avin_25190 por PCR inverso
25190-FD	AGGATCCACGGGAGTGACGAGTA TG	pLA38B	Eliminación de Avin_25191 por PCR inverso
25190-RD	CATGCAGCGGAATCACAG		
29300-F	GCATGAATGCGCACATCG	DNA	Amplificación de Avin_29300 contenido en el plásmido pLA39
29300-R	TGTACGGCCTGTTCCAGGAG	cromosomal	
33420-F	CTCCAGGAGCCGGTATATG	DNA	Amplificación de Avin_33420 contenido en el plásmido pLA40
33420-R	AAGTCTCGCTCGTCACTTC	cromosomal	
48220-F	ACGACCTGACTCAGTACC	DNA	Amplificación de Avin_48220 contenido en el plásmido pLA41
48220-R	GACTATAACCGCTTCAAC	cromosomal	
48220-DR	TAAAGCTCCGCTCCGGACTG		
48220-DF	TGGATCCTCAGTTAGGGCGGAAG CTC	pLA41	Eliminación de Avin_48220 por PCR inverso
48930-F	CCAGATCATGGCGCACTAC	DNA	Amplificación de Avin_48930 contenido en el plásmido pLA43
48930-R	GGCGGGTATCGTTGTAGAC	cromosomal	
49060-F	CGCTGACCACGATCAAATG	DNA	Amplificación de Avin_49060 contenido en el plásmido pLA44
49060-R	ATTGCCGATCAGCGGGATCGAC	cromosomal	
51660-F	CGATCTCACGGTCATCAG	DNA	Amplificación de Avin_51660 contenido en el plásmido pLA45
51660-R	GAGCAGCTCCTTGAGTTC	cromosomal	
34930-FBh	TGGATCCTTGCTGGCCCTGCTCGA GGG	DNA	Amplificación de Avin_34930 contenido en el plásmido pLA46
34930-R	ACATTCTAGCCGCCGTGTCTG	cromosomal	
25160-F	CTGAGCCAATTCCTGAAC	DNA	Amplificación de Avin_25160 contenido en el plásmido pLA47
25160-R	CAGGTGTTTCTGGTACTC	cromosomal	
50640-F	ATCGCCCATACCCTCAAG	DNA	Amplificación de Avin_50640 contenido en el plásmido pLA48
50640-R	CTGTTCTGTCAGCCACTTG	cromosomal	
00420-F	ACCAGGATCTGTCACTTG	ATCC9046	Amplificación de Avin_00420 contenido en el plásmido pJGAT255
00420-R2	ATCCAGTTGCTCGACATCC	DNA cromosomal	
00420-RD	TCC ATT CTG CGG CCT GTT G		
00420-FD	ACG GAT CCA CCT GCA ACT GAC CGT GAG	pJGAT255	Eliminación de Avin_00420 por PCR inverso
amrZ-F	GATACTCTGCCAAGCTTC	DNA	Amplificación de <i>amrZ</i> contenido en el plásmido pLA60
amrZ-R	TGATGACGGGCGCAATGAC	cromosomal	
FleQ-F	GGCTTGGCTGGAAGCATTG	DNA	Amplificación de <i>FleQ</i> contenido en el plásmido pLA62
FleQ-R	GGCAGTCAGCACACGATAG	cromosomal	
qgyrAL-F	CAA GCT GGC CCA TGA ACT GCT C		Ensayo de qRT-PCR
qgyrAL-R	TGG GAA TCC TGG TCG GCA TCA C		Ensayo de qRT-PCR
qPCR-mucG-F	TCG ACC GAA CCC GTT TCG AG		Ensayo de qRT-PCR
qPCR-mucG-R	GAT CAG GCG GTG GTA GAG AC		Ensayo de qRT-PCR

5.2 Condiciones de cultivo.

Las cepas de *A. vinelandii* se cultivaron en medio Burk-Sacarosa (BS), cuya composición se muestra en la Tabla 4, con su respectivo antibiótico en medio sólido. La concentración de antibiótico utilizada fue de 30 µg/ml de ácido nalidixico (Nal), 1 µg/ml de gentamicina (Gm), 1 µg/ml de kanamicina (Km), 50 µg/ml de espectinomicina (Sp) y 30 µg/ml de tetraciclina (Tc). Para la

preparación de medio sólido se agregó agar a una concentración final de 1.5%. Todas las soluciones fueron esterilizadas 20 min a 120 °C en autoclave, a excepción del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que fue filtrado para evitar la rápida oxidación del hierro. Ambos medios, sólido y líquido fueron incubados 30° C por 48 h. El cultivo líquido se incubó con una agitación de 200 rpm en una incubadora con un radio de orbital de 2.5 cm. Para el experimento de cuantificación de c-di-GMP a diferentes OTR se utilizaron matraces de 500 ml con volumen de llenado de 50, 100 y 200 ml de BS.

Tabla 4 Composición del medio BS

Reactivo	Concentración en g/L
Sacarosa	20
Amortiguador de fosfatos (pH=7.2)	
K_2HPO_4	0.8
KH_2PO_4	0.2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.073
Na_2SO_4	0.183
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.160
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0002
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005

El medio de competencia (CM) de *A. vinelandii* contiene todas las sales de la Tabla 4 a la concentración indicada con excepción de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

E. coli se cultivó en medio Luria (LB) con su antibiótico correspondiente tanto en medio líquido como sólido. La concentración de antibiótico utilizada fue de 200 µg/ml de Ap, 15 µg/ml de Nal, 10 µg/ml de Gm, 30 µg/ml de Km, 50 µg/ml de Sp y 15 µg/ml de Tc. La composición del medio se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del medio LB

Reactivo	Concentración en g/L
Bacto triptona	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro de sodio	10

Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C y en el caso de medio líquido este se agito a 200 rpm.

5.3 Preinóculos

Los preinóculos se prepararon transfiriendo una asada de una caja fresca a 25 ml de medio BS líquido en un matraz de 125 ml. Se incubó a 30 °C durante 18 h con agitación de 200 rpm. Estos fueron utilizados para inocular matraces de 250 ml con 50 ml de medio BS, que se incubaron en las

mismas condiciones de los preinóculos y fueron utilizados para cuantificar la producción de alginato, cuantificar c-di-GMP y determinar el PM del alginato. Se cuantificó la cantidad de proteína de los preinóculos a las 18 h con la finalidad de inocular los matraces de 250 ml con la misma cantidad de proteína, alrededor de 350 µg/ml que corresponde aproximadamente a una inoculación al 2% v/v cuando se utiliza la cepa silvestre AEIV. Para el experimento de distintas condiciones de OTR, se utilizaron preinóculos de 50 ml en matraces de 250 ml, después de cuantificar proteína se inocularon los matraces con aproximadamente el 2% v/v del volumen de llenado del matraz, 1 ml para los matraces de 50 ml, 2 ml para los matraces de 100 ml y 4 ml para los matraces de 200 ml. Estos matraces se incubaron en las mismas condiciones que los matraces de 50 ml.

5.4 Preparación de células competentes *A. vinelandii*.

A. vinelandii se cultivó en medio CM sólido 48 h a 30°C. Posteriormente, a partir de esta caja de CM se inoculó una segunda caja estriando en toda la superficie de esta y se incubó a 30 °C por un tiempo de 15 a 18 h. Las células se recogieron con una espátula estéril y se transfirieron a tubos de 15 ml donde se realizaron los lavados de las células con una solución de MgSO₄ 20 mM para remover el alginato. Se utilizó un tubo de 15 ml por caja de CM. Se realizaron dos y tres lavados para las células de fenotipo silvestre y mucoide, respectivamente. Las células se centrifugaron a 5 000 rpm durante 5 min. Una vez obtenidas las células limpias sin alginato, estas fueron resuspendidas en un volumen de 300 µl de MgSO₄ 20 mM y fue dividido en dos porciones de 150 µl para realizar la transformación con DNA. Una caja de CM alcanza para realizar dos transformaciones y la transformación se realizó el mismo día que se obtuvieron las células.

5.5 Transformación de células competentes de *A. vinelandii*.

Se utilizaron 150 µl de células competentes y fueron mezcladas con 5 µg de plásmido lineal en un tubo estéril de 1.5 ml. Posteriormente se colocó la mezcla sobre la superficie de una caja de CM y se extendió con la punta de la micropipeta hasta abarcar una superficie de aproximadamente 2 cm² y se incubó a 30 °C por 48 h. Las células fueron colectadas y lavadas de la misma manera que las células competentes con el objetivo de remover el alginato. Las células fueron resuspendidas en 300 µl de MgSO₄ 20 mM y por último se plateo un volumen de 100 µl en medio de selección. Las cajas de selección fueron incubadas a 30 °C y un tiempo de 48 a 72 h.

5.6 Preparación de células competentes de *E. coli*.

Se inició con el pase de una colonia aislada en una caja de *E. coli* DH5α a una segunda caja, esta fue cultivada por un tiempo de 12 – 15 h a 37 °C. De esta caja se inoculó 5 ml de LB líquido y

se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente se inoculó 100 ml de LB líquido con 1 ml del cultivo previo y se incubó por aproximadamente 3 h a 37 °C y 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica dentro del rango 0.4 – 0.5. Se transfirió el cultivo a tubos de propileno previamente enfriados y se dejó reposar 10 min en hielo. Las células se centrifugaron a 4 000 rpm durante 10 min a 4 °C, se resuspendieron las células en 30 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y se dejó reposar por 15 min en hielo. Se centrifugó por segunda ocasión a las mismas condiciones descritas anteriormente y se resuspendieron las células suavemente en 2 ml de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M y 14% de glicerol por cada 50 ml de cultivo original. Por último, se alicuotó 0.2 ml en tubos de 1.5 ml y se almacenaron a -70 °C

5.7 Transformación de células competentes de *E. coli*.

Se utilizaron 0.2 ml de células competentes y fueron mezcladas con ADN (10-100 ng) y se incubaron 30 min en hielo. Posteriormente se dio un choque térmico de 2 min a 42 °C y rápidamente se añadió 1 ml de LB sin antibiótico y se incubó la mezcla a 37 °C y 200 rpm durante 1 h. Por último, se plateó un volumen de 50 µl en medio de selección.

5.8 Manipulación de ácidos nucleicos

Los procedimientos para la manipulación de DNA se realizaron según lo descrito por Sambrook *et. al.*, 1989 (Sambrook et al., 1989). Se utilizó el genoma disponible de *A. vinelandii* DJ, GenBank CP001157.1 (Setubal et al., 2009) para el diseño de los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 3, en esta tabla también se mencionan los diferentes templados utilizados para los oligonucleótidos.

5.9 Reacción de PCR

Para la realización de la amplificación de los genes se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity ADN Polymerase (Thermo Fischer Scientific) siguiendo los parámetros establecidos dentro del protocolo de la enzima.

5.10 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas para la construcción de los plásmidos utilizados en este trabajo se mencionan en la Tabla 2. Todas son de la marca Thermo Fischer Scientific y se utilizaron siguiendo los parámetros de cada enzima.

5.11 Reacción de ligación

Para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR con la enzima Phusion High-Fidelity ADN polimerase en el vector pJET2.1/Blunt se utilizó el protocolo proporcionado por el Kit de clonación de PCR CloneJET™ de marca Thermo Fischer Scientific.

Las demás reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fischer Scientific) y cuando fue necesario la obtención de extremos romos o razurados se utilizó la enzima Fragment Klenow (Thermo Fischer Scientific), ambas enzimas fueron utilizadas siguiendo los protocolos del fabricante.

Estas reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final en el rango de 20 a 50 μ l y toda la mezcla de ligación fue utilizada para transformar células competentes *E. coli*. Los plásmidos obtenidos se enviaron a la unidad de secuenciación para descartar la presencia de cambios en la secuencia nucleotídica.

5.12 Construcción de mutantes de *A. vinelandii*

La construcción de las mutantes utilizadas en este estudio se menciona en la Tabla 2. Una vez obtenido el plásmido para la construcción de la mutante, este fue digerido con *ScaI* para obtener el plásmido linealizado y fue utilizado para transformar células competentes de *A. vinelandii*. La sustitución del gen por un casete de resistencia se realizó de tal manera que se observa una diferencia notable en el número de pb de los amplicones silvestre y mutado, que facilitó la identificación de cepas mutantes por PCR.

5.13 Ensayo de motilidad

Se prepararon preinóculos transfiriendo una asada de una caja fresca a 25 ml de medio BS líquido en un matraz de 125 ml. Se incubó a 30 °C durante 18 h con agitación a 200 rpm. A partir de estos cultivos, con el objetivo de inocular con la misma cantidad de células, se cuantificó la proteína como una medida del crecimiento microbiano y se inocularon con la misma cantidad de proteína (~350 μ g) unos segundos matraces de 125 ml con 25 ml de medio BS. Estos se incubaron a 30 °C con una agitación de 200 rpm durante 18 h. Posteriormente, se inyectaron 2 μ l de cultivo en cajas de agar suave, que consiste en medio BS suplementado con agar a una concentración final de 0.3%. Los halos de motilidad se visualizaron a las 24 hrs.

5.14 Cuantificación de formación de biopelículas

Se prepararon preinóculos de 25 ml como se mencionó anteriormente y a partir de estos cultivos, con el objetivo de inocular con la misma cantidad de células, se cuantificó la proteína como

una medida del crecimiento microbiano. Posteriormente, se inocularon unos segundos matraces de 125 ml con 25 ml de medio BS con la misma cantidad de proteína (350 µg/ml). Estos se incubaron a 30 °C con una agitación de 200 rpm durante 18 h. 200 µl de estos matraces se inocularon en placas de poliestireno de 24 pozos que contienen 2 ml de medio BS líquido. La placa de 24 pozos se incubó a 30 °C por 48 h sin agitación, una segunda placa procesada de la misma manera sirvió para determinar el crecimiento celular por cuantificación de la concentración de la proteína. Concluidas las 48 h de incubación de la placa, se retiró con ayuda de una pipeta el medio de cultivo, se añadió 2 ml agua destilada para realizar un lavado de las células adheridas a la superficie y posteriormente se añadieron 2 ml de metanol al 70% y se incubó 10 min a temperatura ambiente para fijar las células. Se retiró el metanol y se agregó 2 ml de cristal violeta al 1% para teñir las células y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el cristal violeta, se realizaron dos lavados con 2 ml de agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se disolvió el cristal violeta en ácido acético al 33% y se procedió a hacer la lectura de la absorbancia a 670 nm.

5.15 Cuantificación específica de alginato por el método de Carbazol

El alginato se recuperó de los sobrenadantes de los cultivos de *A. vinelandii*. A 1 ml de cultivo se le añadió 100 µl de EDTA 0.1 M y se centrifugó en tubos de 1.5 ml a 13 000 rpm por 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubos de 5 ml y las células se utilizaron para cuantificar la concentración de la proteína por el método de Lowry. El alginato se precipitó del sobrenadante con 3 ml de isopropanol frío. El alginato se recuperó por centrifugación a 5 000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar dentro del tubo abierto cubierto con una toalla de papel por 24 h. Una vez seco se procedió a la solubilización del alginato en 1 ml de agua MQ por 24 h para lograr una disolución completa y se procedió a la cuantificación por el método de carbazol (Knutson and Jeanes, 1968)

Primero se procedió a la realización de la curva estándar que se preparó de la siguiente manera. De una solución stock de alginato 1mg/ml se tomaron volúmenes de 5, 10, 40, 60,80 y 100 µl y se llevaron a un volumen final de 200 µl. De esta manera se obtiene una curva que va desde los 5 µg a 100 µg de alginato. De las muestras se tomó 50 µl y se llevaron a 200 µl con agua MQ. Los tubos se introdujeron en hielo y se les agregó con cuidado 1 ml de solución fría de ácido sulfúrico/boratos. Después se añadió 100 µl de carbazol, se le dio un vortex de 10 segundos y se introdujeron en un baño de 55 °C por 30 min. Se sacaron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se procedió a leer la absorbancia a 530 nm.

La solución de ácido sulfúrico/boratos se preparó de la siguiente manera. Se vertieron 24.7 g de ácido bórico en 30 ml de agua MQ con poca agitación y se calentó suavemente, al ácido bórico no se disolvió en el agua hasta que se añadieron 10.09 g de KOH. Se llevó esta solución a un volumen final de 45 ml con agua MQ tibia para impedir la precipitación de los boratos. A continuación, se agregaron lentamente 25 ml de la solución de boratos a 975 ml de ácido sulfúrico obteniéndose la solución de ácido sulfúrico/boratos.

El carbazol se preparó disolviendo 50 mg en 50 ml de etanol absoluto dando como resultado una solución al 0.1%.

5.16 Determinación del PM del alginato

El PM del alginato se determinó por cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas Ultrahydrogel (UG 500 y 2000, Waters), utilizando un HPLC con un detector de refractómetro diferencial (Water, 410) tal y como se describió previamente (Peña et al., 1997).

Se utilizó un volumen de 15 ml de cultivo. Se le añadió 1.5 ml de EDTA 0.1 M y 1.5 ml de NaCl 1 M y se centrifugaron las células a 7 000 rpm por 7 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml y se precipitó el alginato con 30 ml de isopropanol frío. El alginato se recuperó por centrifugación a 7 000 rpm por 7 min y se desechó el sobrenadante. El alginato se transfirió a tubos de 2 ml y se secó. Se pesaron 6 mg de alginato para disolverlos en 2 ml de agua MQ con el objetivo de tener una solución de alginato de 3 mg/ml. Esta solución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm y se utilizó para inyectar el HPLC.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes. La fase móvil es NaNO_3 0.1 M con un flujo de 0.9 ml/min y una temperatura de 39 °C. Se inyectaron 100 μl de las muestras y se elaboró una curva estándar utilizando pullulanos de *Aureobasidium pullulans*.

5.17 Cuantificación de c-di-GMP por LC-MS/MS

Se tomó 1 ml de cultivo para la cuantificación de la proteína y el resto del cultivo, 49 ml se utilizó para la extracción del c-di-GMP. Las células se lavaron con EDTA 0.1 M y NaCl 1M para remover el alginato. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de buffer de extracción y se incubó 15 minutos en hielo. El buffer de extracción está compuesto por acetonitrilo al 40%, metanol al 40%, ácido fórmico al 0.1% y agua MQ 19.9%. Se centrifugó 15 min a 13 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos safe-lock de 2 ml y se liofilizó para remover el buffer y resuspender el liofilizado en agua grado HPLC para proceder a la cuantificación. El procedimiento de cuantificación se llevó a

cabo en el laboratorio del Dr. Christopher Waters, en la universidad de Michigan, con quien se estableció una colaboración. De acuerdo al protocolo desarrollado por el grupo del Dr Waters, 10 µl de esta solución fueron inyectados en un equipo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LC-MS/MS. Se utilizó una columna de fase reversa Water BEH C18 2.1 x 50 mm con una fase móvil que consistió en un gradiente de los solventes A y B; el solvente A está compuesto de tributilamina 10 mM y ácido acético 15 mM en una solución agua:metanol que se encuentra en una proporción 97:3, el solvente B es metanol. El gradiente se llevó a cabo de la siguiente manera, t = 0 min; A-99%:B1%, t = 2.5 min; A-80%:B-20%, t = 7.0 min; A-35%:B-65%, t = 7.5 min; A-5%:B-95%, t = 9.01 min; A-99%:B-1%, t = 10 min fin del gradiente. Se realizó una curva estándar de c-di-GMP con las siguientes concentraciones en nM, 1.9 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5 y 125. El c-di-GMP se detectó usando un monitoreo de reacción múltiple en modo ión negativo, la transición seleccionada de m/z fue 689.16→344.31 (Massie et al., 2012). La cantidad de c-di-GMP se normalizó con respecto a la cantidad de proteína correspondiente.

5.18 Cuantificación de proteína

Después de obtener el paquete celular como se describió en el apartado 5.15, estas fueron resuspendidas en un 1 ml de agua MQ, se tomaron 50 µl y se llevaron a un volumen final de 200 µl con agua MQ. Posteriormente se adicionó 1 ml de solución reactiva, que está compuesta por un 98% v/v de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 M, 1% v/v de tartrato de sodio y potasio al 2% y 1% v/v de CuSO₄ al 1%, se dejó reposar por 10 min y se adicionaron 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) diluido con 1 volumen de agua MQ y se dejó reposar 30 min. Se realizó una curva estándar con una solución de albúmina de 1 mg/ml. Las concentraciones utilizadas en 200 µl de volumen fueron 50, 100, 200 y 400 µg/ml. Al término de los 30 min se procedió a realizar las lecturas de absorbancia a 625 nm y con ayuda de la curva patrón se determinó la concentración de proteína (Lowry et al., 1951).

5.19 Búsqueda de motivos de unión de AmrZ y FleQ

Para la realización de la búsqueda de posibles sitios de unión de los reguladores AmrZ y FleQ en *A. vinelandii*, primero se identificaron los motivos de unión de estos reguladores con el servidor de “MEME suite” con acceso en la siguiente liga <http://meme-suite.org/tools/meme>. Posteriormente, se utilizó la matriz de posición en peso, obtenida en la generación de estos motivos, para la búsqueda de sitio consenso en las regiones río arriba de los genes de *A. vinelandii*. Las secuencias utilizadas para la generación del motivo del regulador AmrZ se obtuvieron de Jones et al (Jones et al., 2014), un total de 357 secuencias reportadas se seleccionaron para la construcción del motivo de AmrZ. Para

el regulador FleQ se utilizaron 13 secuencias tomadas de Baraquet y Harwood 2016 (Baraquet and Harwood, 2016). Las secuencias rio arriba de cada gen de *A. vinelandii* corresponden a los nucleótidos de -400 a +50 con respecto al ATG y se obtuvieron de la secuencia del genoma con referencia en el GenBank CP001157.1 con ayuda del software Artemis. La búsqueda de motivos se realizó con el servidor Regulatory Sequence Analysis Tool (RSAT, http://rsat.sb-roscoff.fr/matrix-scan-quick_form.cgi), en el menú de Pattern Matching se seleccionó la opción matrix-scan(quick) donde se proporcionó el archivo FASTA de las secuencias rio arriba y la matriz correspondiente en formato MEME. Un análisis con un valor límite de p-val de 0.0001 arrojó 855 secuencias para AmrZ y 449 para FleQ. En el Anexo 1 se muestran los 100 genes con un p-value más pequeño para cada regulador.

5.20 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prims (versión 8) (GraphPad Software, La Jolla, CA). La significancia estadística fue determinada usando análisis t-Student y Anova de una via con una prueba post doc Dunnett's, donde un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de las DGC y PDE putativas en *A. vinelandii*

Los mecanismos de señalización por c-di-GMP no se habían estudiado en *A. vinelandii*, por esta razón iniciamos con la identificación de todas las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de este segundo mensajero codificadas en el genoma de esta bacteria.

El genoma anotado de *A. vinelandii* corresponde a la cepa DJ, una cepa que no produce alginato, con el número de referencia de NCBI NC_012560.1 y que codifica para 26 proteínas con dominios GGDEF/EAL. Trece tienen un dominio único de GGDEF, 10 son proteínas híbridas GGDEF-EAL (DGC-PDE) y tres tienen dominios de PDE, una tiene el dominio EAL y dos tienen el dominio HD-GYP. Por otro lado, en este trabajo utilizamos la cepa AEIV que sí produce alginato pero cuyo genoma aún no se encuentra en las bases de datos. El genoma de esta cepa codifica también para 26 proteínas con dominios GGDEF/EAL; catorce con dominio GGDEF único, nueve son proteínas híbridas y tres tienen dominios de PDE, una tiene el dominio EAL y dos tienen el dominio HD-GYP. En la Figura 11 se muestra la arquitectura de dominios de todas estas proteínas, correspondientes a la cepa AEIV, obtenida con ayuda del servidor SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). En ella se puede observar que todas las PDE contienen conservados los aminoácidos característicos EAL y HD-GYP. Para el caso de las DGC con dominio único GGDEF, 11 poseen la secuencia del dominio GGDEF conservado sugiriendo que son funcionales y tres son dominios GGDEF degenerados, siendo los genes Avin_33420 y Avin_48930 los dominios GGDEF más degenerados. Con respecto a las proteínas híbridas, todas contienen conservada la secuencia EAL de sus dominios de PDE y solo cinco poseen conservada la secuencia GGDEF de su dominio de DGC.

Además de los dominios de DGC y PDE, se identificaron otros dominios, que están involucrados en la transducción de señales. Se identificaron dominios PAS y PAC, que responden a diversos estímulos como luz, oxígeno y potencial redox (Taylor and Zhulin, 1999). Dominios HAMP, presentes en diversas histidin quinazas, proteínas aceptadoras de grupos metilo y adenilato ciclasas (Galperin, 2004). Dominios REC o dominio receptor de grupos fosforilo tipo CheY (Galperin, 2004). Dominio GAF, que debe su nombre porque está presente en diversas fosfodiesterasas de cGMP, adenilato ciclase de *Anabaena* y la proteína FhlA de *E. coli*, el dominio GAF tiene una estructura muy similar al dominio PAS y puede unir moléculas pequeñas desde flavinas hasta nucleótidos como adenina (Galperin, 2004). Dominio MHYT, que consiste en 6 segmentos transmembranales, de los cuales 3 contienen altamente conservados los residuos de metionina, histidina y tirosina, se sugiere

que este dominio podría unir moléculas de gases diatómicos como O₂, CO y NO (Galperin et al., 2001). Dominio CBS, este dominio se identificó primeramente dentro de la proteína cistationina β-sintasa y de ahí deriva su nombre, aunque se desconoce su función se presume que posee funciones regulatorias, y mutaciones en residuos conservados son las responsables de distintas enfermedades en humanos (Scott et al., 2004). Dominio 7TMR-DISMED2/7TMR-DISM-7TM, que se encuentra en el extremo N-terminal de las proteínas y consiste en 7 helices transmembranales embebidas en la membrana y se sugiere responde a carbohidratos (Anantharaman and Aravind, 2003). Dominio CACHE, este es un dominio periplásmico o extracelular que se encontró primeramente en canales de Ca²⁺ y receptores de quimiotaxis, se sugiere que une a moléculas pequeñas (Anantharaman and Aravind, 2000). Dominio CHASE, es un dominio extracelular identificado en receptores de citoquinas, histidin kinasas y adenilato ciclasas, se sugiere que une a ligandos pequeños de bajo peso molecular como citoquinas, derivados de adenina y péptidos (Anantharaman and Aravind, 2001). Dominio sensor de globina es un dominio tipo-mioglobina, detecta oxígeno que se une a su grupo hemo (Thijs et al., 2007). La presencia de estos dominios sensores sugiere que después detectar la señal, pueden modular la actividad de síntesis y degradación de c-di-GMP de las DGC, PDE y de las proteínas híbridas.

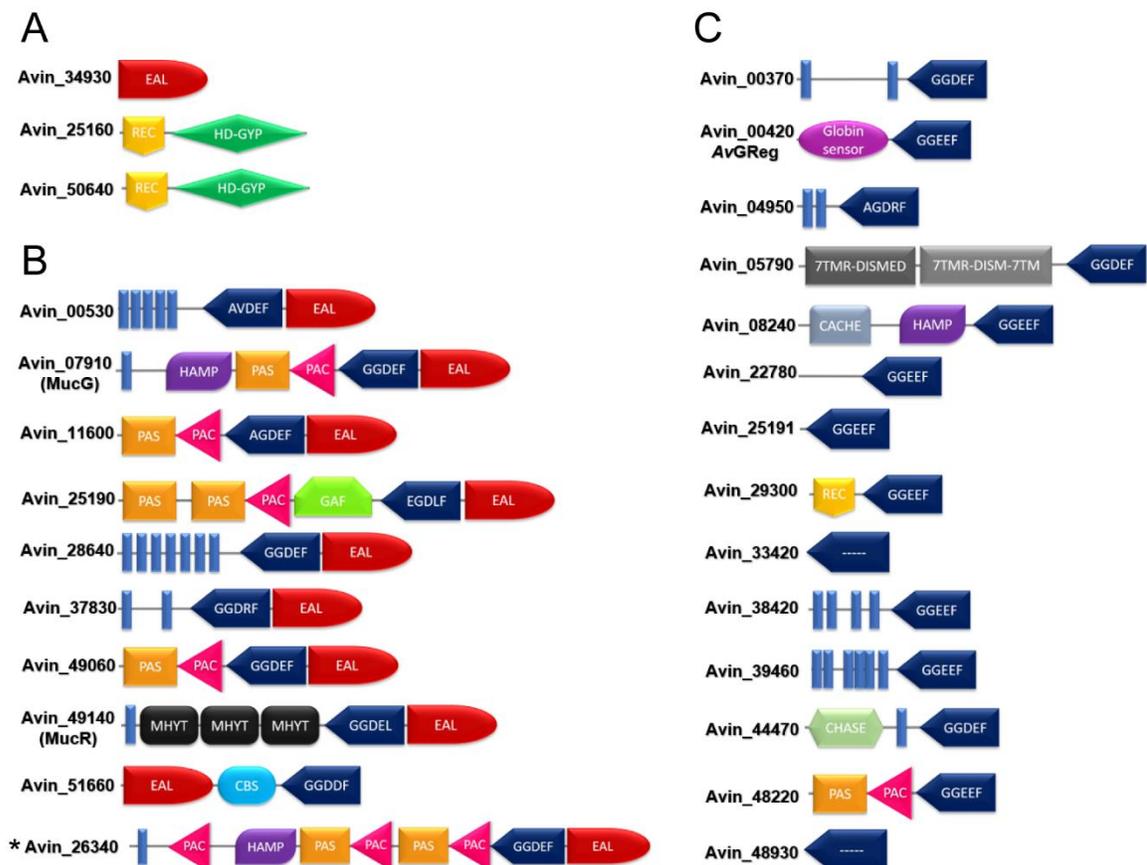


Figura 11. Representación esquemática de DGCs y PDEs de *A. vinelandii*. A) Proteínas con dominio EAL (en rojo) y HD-GYP (rombo verde). B) Proteínas híbridas GGDEF-EAL. C) Proteínas con dominio GGDEF (azul). Se muestra la secuencia de aminoácidos característica de los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP, dentro del dominio correspondiente. Las DGCs codificadas en los genes *Avin_33420* y *Avin_48930* poseen esta secuencia totalmente degenerada. Además, se muestran los dominios sensores PAS, HAMP, GAF, MHYT, CACHE, 7TMR-DISMED/7TMR-DISM-7TM, dominio globina, CBS, REC y CHASE. Los rectángulos azules verticales corresponden a hélices transmembranales. Con asterisco, *, se señala la proteína híbrida *Avin_26340* codificada solo en el genoma de la cepa DJ.

Es importante mencionar que un análisis de la secuencia del gen *Avin_25190* en la cepa AEIV, nos permitió identificar dos genes independientes (mostrados en la Figura 11 como *Avin_25190* y *Avin_25191*) con una región intergénica de 301 pb. La diferencia en la secuencia de la cepa DJ, con respecto a la secuencia de la cepa AEIV, es la ausencia de un nucleótido de guanina en una región rica en guaninas, cambiando el marco de lectura abierto (Figura 12). Por otro lado, el gen *Avin_26340*, marcado con un asterisco en la Figura 11, no se encuentra presente en el genoma de la cepa silvestre AEIV a diferencia de la cepa DJ.

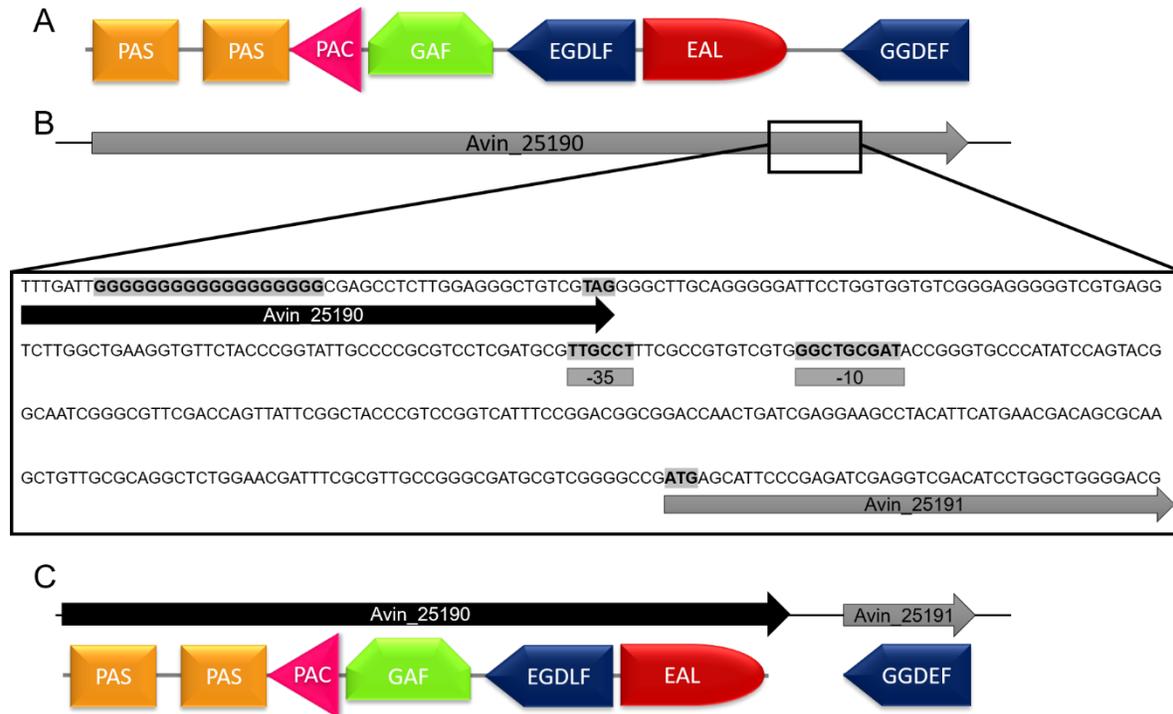


Figura 12. Análisis de secuencia del locus 25190. A) Arquitectura de dominios de la proteína codificada en el gen *Avin_25190* de la cepa DJ (GenBank CP001157.1). B) Secuencia de nucleótidos del gen *Avin_25190* donde se muestra la región rica en nucleótidos de guaninas (resaltadas en gris) justo antes del codón de paro de la traducción. Un promotor $\sigma 70$, identificado con softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), dirige la transcripción del gen *Avin_25191*. C) Arquitectura de dominios de las proteínas codificadas en los genes *Avin_25190* y *Avin_25191* de la cepa silvestre AEIV.

6.2 El c-di-GMP afecta positivamente la producción y PM de el alginato

La participación del c-di-GMP en la síntesis de alginato en *A. vinelandii* no había sido investigado, el fenotipo de sobre producción de alginato observado en la cepa $\Delta mucG$ nos sugiere que el c-di-GMP esta involucrado en este proceso. Por lo tanto, nuestro primer experimento fue analizar si pozas artificiales de este segundo mensajero impactaban la cantidad y el PM de este polímero. Para este análisis decidimos construir cepas sobre-productoras de proteínas con dominios conservados de DGC o PDE, en el fondo silvestre de *A. vinelandii*. Las proteínas seleccionadas para modular las pozas de c-di-GMP contienen dominios únicos de DGC (GGDEF) o PDE (HD-GYP).

La DGC seleccionada está codificada por el gen Avin_00420, que codifica para una DGC soluble de 52.8 kDa, con un dominio sensor de globina y el dominio GGDEF. Además, posee un 35.1% de identidad con la DGC DgcO (inicialmente llamada DosC) de *E. coli* y posee todos los residuos catalíticos conservados, así como también tiene el sitio de inhibición alostérica por producto (sitio I). Para el caso de la PDE, utilizamos el gen Avin_50640, que codifica para una PDE soluble de 38.5 kDa con un dominio REC y un dominio HD-GYP, este último posee un 50% de identidad con el dominio HD-GYP de la proteína PmGH, una PDE con dominios GAF/HD-GYP de *Persephonella marina* EX-H1, una fosfodiesterasa HD-GYP cuya actividad de hidrólisis de c-di-GMP ha sido desmostrada (Bellini et al., 2014). En la Figura 13 se muestran los alineamientos de las proteínas Avin_00420 y Avin_50640 con las proteínas DgcO y PmGH, respectivamente.

A

DgcO	298	DVLTKLLNRRFLPTIFKREIAHANRTGTPLSVLIIDVDFKKEINDTWGHNTGDEILRKVS
Avin_00420	301	DVLTHMLNRKFLPVILAKEVAYARQNSRFAVLAVDIDRFKHIINDEFGHEAGDVLVQLLA
DgcO		QAFYDNVRSSDYVFRYGGDEFIIVLTEASENETLRTAERIRSRVEKTKLKAANGEDIAALS
Avin_00420		SLLSNHCRGGDYVFRMGGEFLVLLVDVDTQAHALGVAEKLKQQAAQERFRLPGEQDLQLT
DgcO		LSIGAAMFNGHPDYERLIQIADEALYIAKRRGRNRVELWKASL- 460
Avin_00420		VSIGVALHDGHPDYQHLLRQADRALYEAKHGGRNQVVLARKLDG 464

B

PmGH	158	AILEYKLLKKAHEDVIYRLSHATKFKDPEITQNHIIIRVGLYCEILAREAGLDEEDVELVKLA
Avin_50640	134	EQRTAELLRTRQQIVRRLSRAAEFRDNETGNHIIVRMSHIARLIAQAAGMGAEFVETLFNA
PmGH		APMHDIGKIVGIPDRVLLKPGKLNDEEWEIMKKHTIYGYEILKGGDSRLLQIAADIAIEHH
Avin_50640		APMHDIGKIGIPDSILFKSGRLEPEEWAIMRRHTEIGAKIIGRHDDLLKAAHSIALHHH
PmGH		ERWDGTGYPFGKKGEEISYGRMSTISDVFDALTSDFPYKKAWMDMRTVTRFF 329
Avin_50640		EKWDGSGYPQGLGGEEIPLMARIAAVADVFDALTSARPYKKAWPLEEAVGYI 305

Figura 13. Alineamientos de la DGC y PDE seleccionadas. A) Alineamiento de los dominios GGDEF de las proteínas Avin_00420 y DgcO de *E. coli*. En fondo gris y escrito en negro se resaltan los aminoácidos necesarios para la catálisis y

en fondo gris y escrito en blanco se resalta el sitio de inhibición de los dominios GGDEF. B) Alineamiento de los dominios HD-GYP de las proteínas Avin_50640 y PmGH de *P. marina* EXH1. De igual manera los aminoácidos resaltados en gris son importantes para la actividad PDE de los dominios HD-GYP

La sobre-producción de la DGC incrementó los niveles de c-di-GMP hasta 6 veces comparado con la cepa silvestre AEIV (Figura 14). Esta cepa DGC+, produjo tres veces más alginato que la cepa silvestre y el PM promedio del alginato se triplicó (1697 vs 513 kDa), este PM también supera el PM del alginato de las mutantes deficientes en MucG (~1100 kDa). De manera contraria, y como era de esperarse de una PDE activa, la sobre-producción de la PDE HD-GYP (PDE+), redujo 17 veces los niveles de c-di-GMP con respecto a la cepa silvestre AEIV y la producción del polímero disminuyó 12 veces (Figura 14). Es importante mencionar que la cepa PDE+ es una cepa que no produce alginato, el valor observado en el gráfico es el obtenido con el método de cuantificación de Carbazol, con el cual se obtiene un valor de aproximadamente 0.2 μg alginato/ μg de proteína en cepas que no producen alginato como la cepa *algD*⁻ que se muestra en la Figura 16.

Estos resultados indican que, efectivamente, la cantidad y el PM del alginato son regulados por las pozas de c-di-GMP y sugieren que el fenotipo observado en las cepas mutantes en *mucG* se debe a un aumento en los niveles de este segundo mensajero. Muy probablemente MucG actúa como una PDE en las condiciones del experimento.

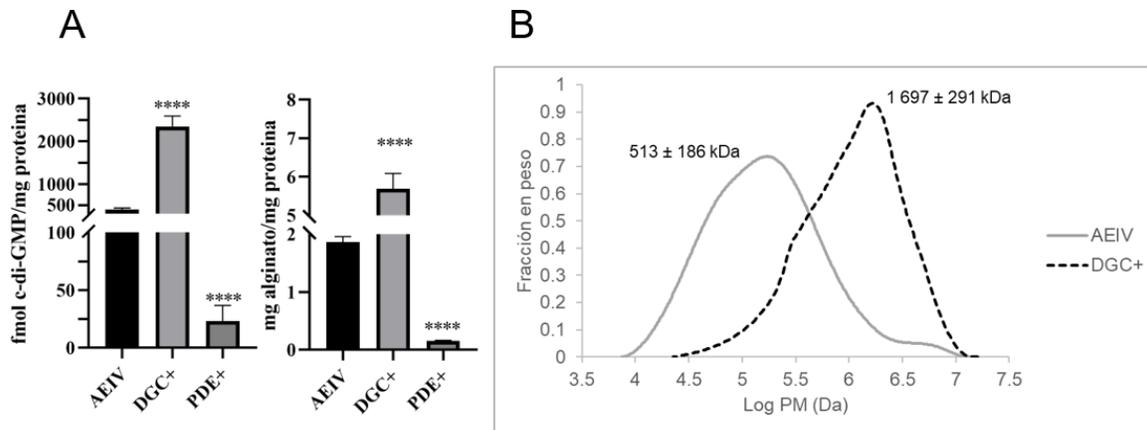


Figura 14. Efecto de los niveles artificiales de c-di-GMP sobre la producción de alginato en *A. vinelandii*. (A) Cuantificación de c-di-GMP (Panel izquierdo) y producción de alginato (panel derecho) en la cepa AEIV y sus derivadas que sobreproducen la DGC Avin_00420 (DGC+) o la PDE Avin_50640 (PDE+). (B) Distribución de pesos moleculares de alginatos producidos por las cepas AEIV y DGC+. Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (****p<0.0001).

6.3 MucG es un PDE activa y necesita de su dominio GGDEF intacto

Para determinar si MucG posee actividad PDE, decidimos cuantificar los niveles de c-di-GMP en las cepas silvestre (AEIV), ΔmucG y la variante con el alelo mutado de MucG (*mucG*^{AAA}).

La ausencia de MucG, así como su variante del dominio EAL inactivo resultó en un aumento en los niveles del segundo mensajero c-di-GMP (Figura 15A). Estos resultados sugieren fuertemente que MucG es una PDE activa capaz de modificar las pozas de c-di-GMP en *A. vinelandii*.

Los resultados anteriores indican que la ausencia de MucG provoca altos niveles de c-di-GMP. Por ello, analizamos el efecto de la sobre-producción de la PDE HD-GYP en la cepa $\Delta mucG$ ($\Delta mucG$ /PDE+). Se observó una severa reducción en los niveles del c-di-GMP, muy por debajo de los observados en la cepa silvestre y por lo tanto menores que los presentes en la cepa $\Delta mucG$ (Figura 15A). Por otro lado, mientras los niveles de producción de alginato fueron mayores en las cepas $\Delta mucG$ y $mucG^{AAA}$ con respecto a la cepa silvestre AEIV, estos disminuyeron hasta niveles casi indetectables en la cepa $\Delta mucG$ que sobre-produce la PDE HD-GYP (Figura 15B). Estos resultados indican que el incremento en la producción de alginato en la cepa $\Delta mucG$ pueden ser suprimidos por la expresión ectópica de una PDE activa, y que el incremento en los niveles de c-di-GMP observados en la cepa $\Delta mucG$ son los responsables del aumento en la producción de alginato.

MucG es una proteína compuesta que contiene tanto el dominio GGDEF y el dominio EAL conservados. Por lo tanto, para conocer la contribución del dominio GGDEF de MucG a la actividad de MucG sobre las pozas globales de c-di-GMP cuantificamos el segundo mensajero en una cepa que produce una variante de MucG con el cambio en los aminoácidos conservados del dominio GGDEF a GGAAF, dicho cambio resulta en la inactivación del dominio y pérdida de la capacidad de sintetizar c-di-GMP. Esta mutante, $mucG^{GGAAF}$, mostró fenotipos muy similares a las mutantes $\Delta mucG$ y $mucG^{AAA}$ (Figura 15), que puede atribuirse a una disminución en la actividad PDE de MucG. Estos resultados apoyan más que la proteína MucG actúa como una PDE y sugiere que esta actividad depende de la presencia del dominio GGDEF conservado.

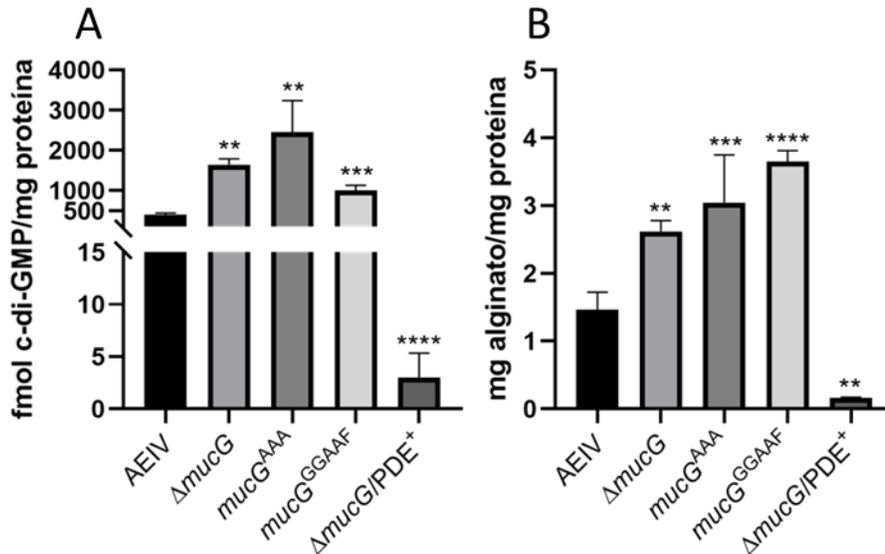


Figura 15. Cuantificación de c-di-GMP (A) y cuantificación de alginato (B) en las cepas silvestre AEIV, y sus mutantes derivadas $\Delta mucG$, $mucG^{AAA}$, $\Delta mucG/PDE^+$ y $mucG^{GGAAF}$ y la cepa sobre-productora de alginato ATCC9046. Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (**p<0.01, ***p<0.001 ****p<0.0001).

6.4 La proteína AvGReg (Avin_00420) es la DGC específica que controla la producción de alginato en *A. vinelandii*.

Los resultados indican que el c-di-GMP es un activador de la producción de alginato y las concentraciones celulares de este segundo mensajero son controladas a través de su síntesis y degradación. Por un lado, tenemos a MucG como una PDE activa que modula las concentraciones de este segundo mensajero, pero desconocemos la identidad de la DGC que sintetiza el c-di-GMP en *A. vinelandii*. En *P. aeruginosa*, se identificó a esta DGC y se le llamó MucR (Hay et al., 2009). En nuestro laboratorio encontramos que MucR no es necesaria para la producción de alginato, pero si es necesaria para la expresión de las AlgE1-7 epimerasas y la producción de quistes resistentes a la desecación como mencionamos en los Antecedentes. Por lo tanto, decidimos identificar a la DGC que reemplaza el papel de MucR en *A. vinelandii*, buscando la disminución de la síntesis del polímero en cepas mutantes donde se eliminaron genes que codifican para DGCs. Se construyeron mutantes en las que se eliminó de forma individual a los 16 genes que codifican proteínas con un dominio GGDEF conservado, estas incluyen a las proteínas MucG y MucR.

Como se puede observar en la Figura 16, solo la ausencia del gen *Avin_00420* resultó en una reducción significativa (en un 70%) en la acumulación de alginato. La complementación de esta mutante (Δ *Avin_00420*) con una copia del gen *Avin_00420* con su promotor silvestre en el *locus melA* demostró que el fenotipo se debía efectivamente a la ausencia del gen *Avin_00420* y no a algún efecto del casete de gentamicina sobre los genes vecinos (Figura 19); el contexto genómico del gen *Avin_00420* se muestra en la Figura 17. Para determinar si la ausencia de *Avin_00420* afecta la poza global de c-di-GMP, se cuantificaron los niveles de este di nucleótido. Nuestros resultados revelaron que los niveles de c-di-GMP disminuyen en un 50% (192.3 ± 14.9 fmol/mg proteína) con respecto a la cepa silvestre AEIV (Figura 18).

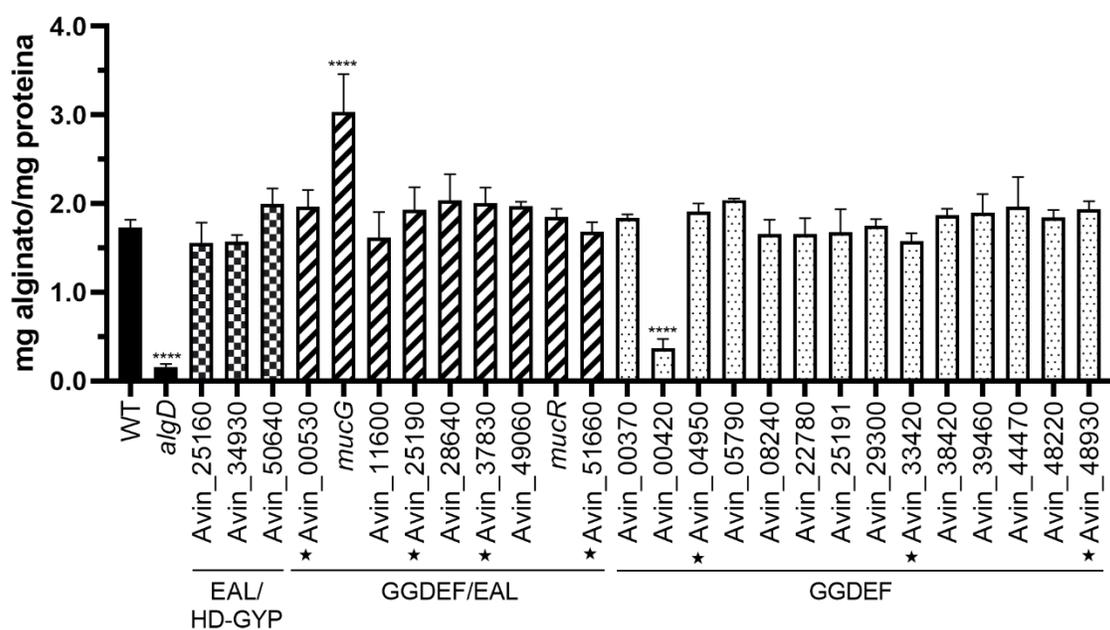


Figura 16. Efecto de las mutaciones en las putativas DGCs y PDEs. Cuantificación de alginato en las cepas silvestre AEIV (WT), 3 fosfodiesterasas (cuadros blancos y negros), 9 proteínas híbridas (líneas diagonales blancas y negras) y 14 DGC (puntos negros). *algD* es un mutante que no sintetiza alginato (control negativo). Los dominios GGDEF degenerados se marcan con una estrella negra. Se utilizó un análisis de análisis de varianza de una vía (ANOVA ONE-WAY) con una prueba post hoc Dunnett's para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (**** $p < 0.0001$).

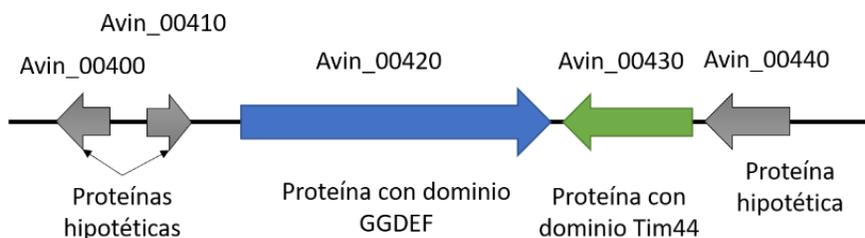


Figura 17. Contexto genómico del gen *Avin_00420* que codifica para la DGC *AvrReg*.

El gen *Avin_00420* codifica para una DGC citoplásmica previamente caracterizada llamada *AvGReg* (Germani et al., 2019; Thijs et al., 2007). *AvGReg* es una proteína de 52.8 kDa con un dominio N-terminal denominado dominio sensor acoplado a globina (GCS, Globin-Coupled Sensor por sus siglas en inglés) y un dominio GGDEF en su extremo C-terminal, homologa a *DgcO* (anteriormente llamada *DosC*) de *E. coli* (Tuckerman et al., 2009). Además, se demostró que la actividad de DGC de *AvGReg* es estimulada por la unión directa del oxígeno al dominio GCS que posee una alta afinidad por esta molécula diatómica (Germani et al., 2019). En resumen, los resultados indican que la DGC, *AvGReg* codificada en el gen *Avin_00420*, es la DGC que sintetiza el c-di-GMP necesario para activar la producción de alginato en *A. vinelandii*.

Por otro lado, es importante mencionar, que los genes *Avin_04950*, *Avin_33420* y *Avin_48930*, codifican para DGC con dominios GGDEF degenerados y para descartar que estas proteínas desempeñaran algún papel regulatorio funcionando como efectores de c-di-GMP, también fueron mutadas y evaluadas con respecto a la producción de alginato. Como se puede observar en la Figura 16, la inactivación de estas DGC degeneradas resultó en una producción de alginato a niveles silvestres, por lo tanto, no están involucradas en el proceso de biosíntesis de alginato.

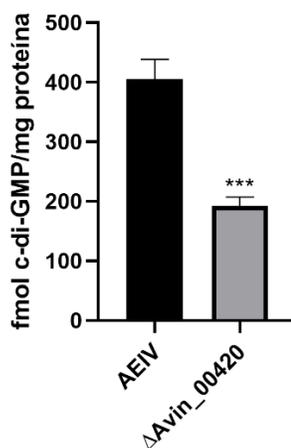


Figura 18. Cuantificación de c-di-GMP en las cepas silvestre AEIV y su derivada mutante Δ *Avin_00420* (*AvGReg*⁻). Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (***) $p < 0.001$.

6.5 MucG es la única PDE que controla el proceso de biosíntesis de alginato

La identificación de la DGC, *AvGReg*, así como los resultados de la actividad PDE de MucG indican que estas dos proteínas forman parte del módulo de control por c-di-GMP que regula la producción de alginato. Sin embargo, para descartar el papel de otras PDE en este proceso se evaluó

la producción de alginato de las mutantes en los genes que codifican para PDEs de *A. vinelandii*. Como se puede observar en la Figura 16, la producción de alginato de todas las mutantes en las PDEs de *A. vinelandii* es similar a la cepa silvestre AEIV, indicando que MucG es la única PDE involucrada en este proceso. Por lo tanto, de manera conjunta con los resultados del apartado anterior, podemos proponer que la DGC AvGReg (Avin_00420) y la PDE MucG (Avin_07910) conforman el módulo de control de c-di-GMP que regula la producción de alginato en *A. vinelandii*.

6.6 En ausencia de la PDE MucG y la DGC AvGReg, otras DGC activan la síntesis de alginato

La DGC AvGReg y la PDE MucG son las proteínas que forman parte del módulo de control de c-di-GMP que regula la producción de alginato. Mientras la mutación en el gen Avin_00420 (AvGReg) propició una disminución en los niveles de c-di-GMP y en la producción de alginato, la mutación en $\Delta mucG$ propició un aumento en la concentración del c-di-GMP y en la producción de alginato. Si AvGReg es la única DGC que participa en la síntesis de alginato, su ausencia en el fondo de la mutante $\Delta mucG$ revertiría el fenotipo de sobreproducción de alginato abatiendo los niveles de este polímero. Se construyó la doble mutante $\Delta mucG/\Delta Avin_00420$ y aunque se observó una disminución de la producción de alginato con respecto a la mutante $\Delta mucG$, esta no fue menor que la producción de la cepa silvestre (Figura 19).

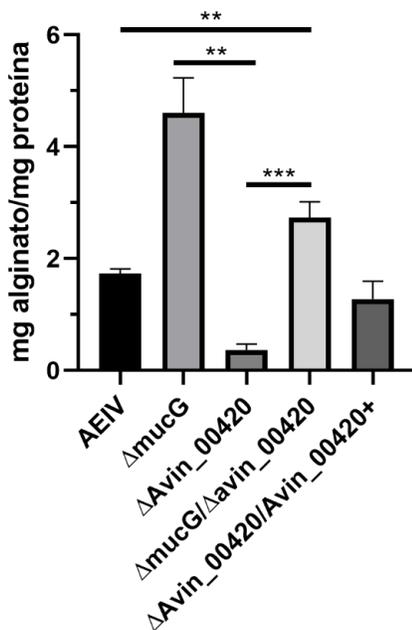


Figura 19. Efecto de las mutaciones dobles $\Delta mucG$ y $\Delta Avin_00420$ (*AvGReg*) sobre la producción de alginato. Cuantificación de alginato en la cepa parental AEIV (WT) y sus derivadas mutantes $\Delta mucG$, $\Delta Avin_00420$ y doble mutante

$\Delta mucG/\Delta Avin_00420$. Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (**p<0.01, ***p<0.001).

La cuantificación de c-di-GMP en la mutante $\Delta Avin_00420$ ($AvGReg^-$) mostró que en las condiciones del experimento existen otras DGCs que sintetizan c-di-GMP, porque los niveles del segundo mensajero solo disminuyeron a la mitad (Figura 18), sin embargo, esa concentración de c-di-GMP no es suficiente para mantener una producción de alginato a niveles silvestres cuando la proteína MucG está presente. Por otro lado, cuando se elimina MucG en el fondo $\Delta Avin_00420$ (mutante $\Delta mucG/\Delta Avin_00420$) los niveles de alginato se incrementan por encima de la producción de alginato de la cepa silvestre. Esto sugiere que en ausencia de la actividad PDE de MucG, el efector de c-di-GMP, el dominio PilZ de Alg44, responde al c-di-GMP sintetizado por DGCs que no son específicas del proceso de biosíntesis de alginato.

6.7 La velocidad de transferencia de oxígeno regula el PM del alginato modulando los niveles de c-di-GMP

Además de los dominios GGDEF y EAL la proteína MucG posee un dominio HAMP y un dominio PAS, este último descrito como un dominio que detecta oxígeno o el estado redox de la célula (Ahumada-Manuel et al., 2017). Además, estudios previos demostraron que una disminución en la OTR en el cultivo de *A. vinelandii* generaba un aumento en el PM del alginato (Díaz-Barrera et al., 2009, 2007; Flores et al., 2014; Lozano et al., 2011), motivo por el cual exploramos el PM del alginato producido en distintas condiciones de OTR (Figura 20A) (Ahumada-Manuel et al., 2017). Por esto, nos preguntamos si este aumento en el PM del alginato, en distintas condiciones de OTR, se debía a un aumento en los niveles de c-di-GMP y si este aumento dependía de la proteína MucG. Para abordar esta pregunta cuantificamos el c-di-GMP en las condiciones de OTR donde habíamos observado previamente el aumento en el PM del alginato. En la Figura 20 se puede apreciar que en la cepa silvestre los niveles de c-di-GMP aumentan con la disminución en la OTR, esta modulación de los niveles de c-di-GMP por la OTR coincide con el aumento en el PM del alginato en las condiciones de 5.2 a 2.5 mmol O₂/L/h. Por otro lado, en la mutante $\Delta mucG$ en todas las condiciones de OTR los niveles de c-di-GMP fueron mayores a los de la cepa silvestre, lo mismo sucede con el PM del alginato producido, indicando la importancia de la actividad PDE de MucG para controlar los niveles de c-di-GMP y el PM. Sin embargo, los niveles de c-di-GMP aumentan al triple en una OTR de 2.5 mmol O₂/L/h comparado con una OTR de 5.2 mmol O₂/L/h, incluso en la ausencia de *mucG*. Esto sugiere que existen otros componentes del módulo de señalización en respuesta a la OTR que modulan los niveles de c-di-GMP.

Nuestros resultados indican que la OTR controla el PM del alginato a través de modular los niveles de c-di-GMP. Esto podría deberse a una disminución en la actividad PDE de MucG, sin embargo, desconocemos si el dominio PAS de MucG está implicado en esta respuesta a la OTR. Por otro lado encontramos evidencia de que MucG no es el único modulador de la respuesta a OTR, la identidad de estos otros componentes regulatorios se caracterizará en estudios futuros.

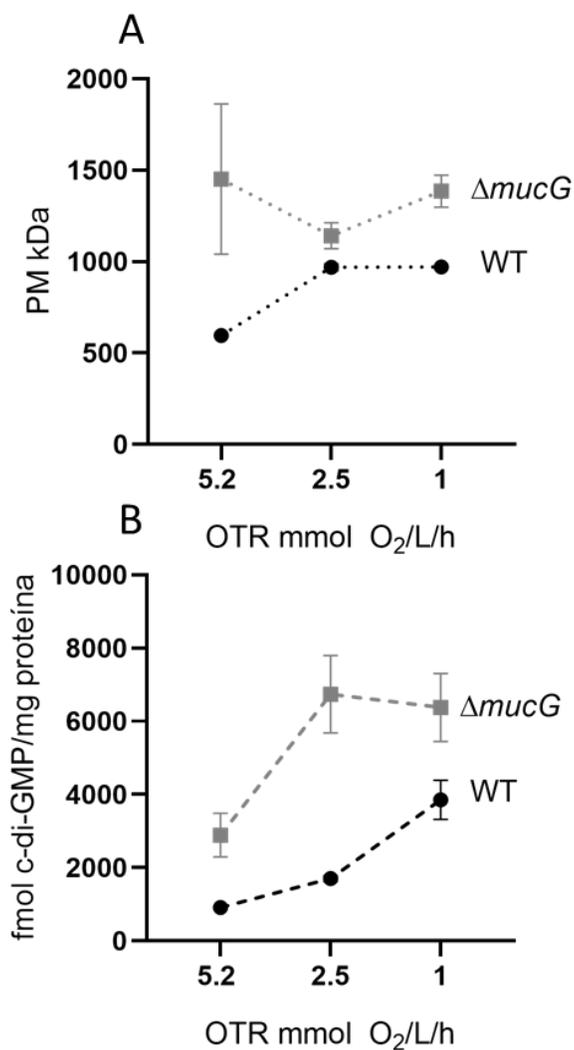


Figura 20. Efecto de la OTR sobre el PM y los niveles de c-di-GMP. A. PM del alginato sintetizado por las cepas WT y mutante $\Delta mucG$ cultivadas en medio líquido Burk's-sacarosa por 48 h a la OTR indicada. B. Cuantificación de c-di-GMP en la cepa WT y en la mutante $\Delta mucG$ en las mismas condiciones de panel A.

6.8 La cepa silvestre, sobre-productora de alginato, ATCC 9046 tiene altos niveles de c-di-GMP

En este trabajo hemos observado que tanto la cantidad como el PM del alginato se incrementan cuando aumentan los niveles del segundo mensajero c-di-GMP en la cepa silvestre AEIV. Por otro lado, la cepa silvestre ATCC 9046 posee una producción de alginato mayor que la cepa silvestre AEIV, además, el alginato sintetizado es de mayor PM (Flores et al., 2014; Núñez et al., 2000). Por lo tanto, creemos que esta cepa ATCC 9046 debe esos fenotipos a que contiene mayores niveles de c-di-GMP que la cepa silvestre AEIV. La cuantificación de c-di-GMP en las cepas ATCC 9046 y AEIV demostró que la concentración de c-di-GMP es 5.7 veces mayor en la cepa ATCC 9046 (Figura 21A). Bajo las mismas condiciones del experimento, la producción de alginato de esta cepa es alrededor de 2 veces mayor que la producción de la cepa AEIV, una producción de alginato comparable a la observada en las mutantes $\Delta mucG$ y $mucG^{AAA}$ (Figura 21A). Además, el PM promedio del alginato sintetizado fue de 2020 ± 250 kDa, aproximadamente 4 veces mayor que el de la AEIV (Figura 21B). Por otro lado, ambas cepas silvestres poseen a la DGC AvGreg y PDE MucG identificadas dentro del módulo de c-di-GMP que activa la producción de alginato en la cepa AEIV. Mientras la mutación de la DGC en la cepa ATCC 9046 redujo la producción de alginato aproximadamente en un 50% (Figura 21A), una mutación en la PDE MucG no potenció la producción del polímero, pero si fue necesaria para controlar el PM del alginato (García et al., 2020). Además, un análisis de los niveles de expresión de *mucG* por qRT-PCR mostró que no existen diferencias entre esas cepas silvestres tanto a 24 (0.986 ± 0.067) y 48 h (1.012 ± 0.105). Estos resultados sugieren que además de la DGC AvGreg y la PDE MucG existen otras DGCs y/o PDEs involucradas en el control de los niveles de c-di-GMP que regulan la producción de alginato en la cepa silvestre ATCC 9046. Uno de los posibles candidatos podría ser el Avin_26340, que no se encuentra en la cepa AEIV, pero si se encuentra en la ATCC 9046. El gen Avin_26340 codifica para una proteína híbrida GGDEF-EAL probablemente posicionada en la membrana interna por medio de una hélice transmembranal. Además, contiene dominios adicionales, un dominio HAMP y dos dominios PAS. Por otro lado, desconocemos el papel que pudiera tener la DGC MucR en la cepa ATCC 9046, probablemente en esta cepa silvestre la proteína MucR si provee las pozas de c-di-GMP tal y como sucede en *P. aeruginosa*.

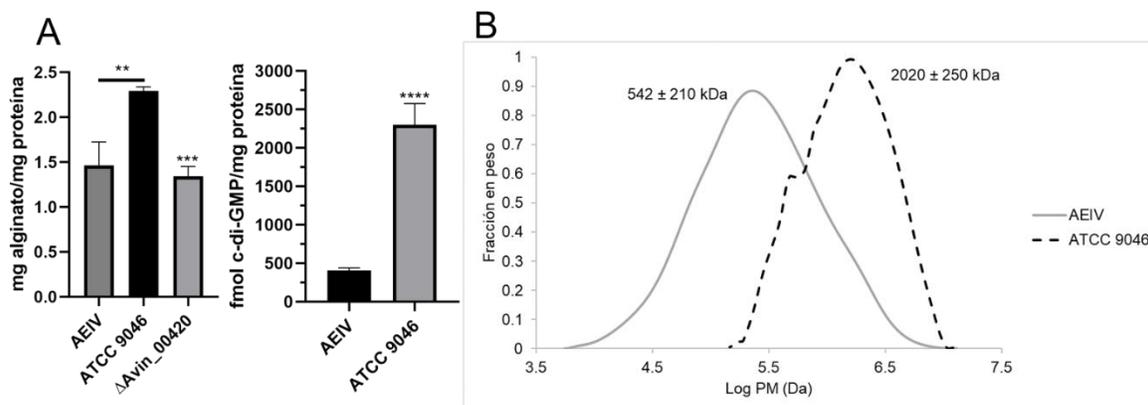


Figura 21. Comparación de las cepas AEIV y ATCC 9046. (A) Producción de alginato (Panel izquierdo) y cuantificación de c-di-GMP (panel derecho) en las cepas AEIV, ATCC 9046 y la derivada mutante Δ Avin_00420 (*AvGReg*) en el fondo silvestre ATCC 9046. (B) Distribución de pesos moleculares de alginatos producidos por las cepas AEIV y ATCC 9046. Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

6.9 FleQ y AmrZ son reguladores del proceso de biosíntesis de alginato

En los Antecedentes de este trabajo puntualizamos que la transcripción del gen *algD* aumenta 3 veces en la cepa Δ *mucG* con respecto a la cepa silvestre AEIV (Ahumada-Manuel et al., 2017). Dicho aumento debe ser un efecto del aumento en los niveles de c-di-GMP, ya que se ha reportado que un aumento en los niveles de c-di-GMP aumentan la transcripción de los genes biosintéticos de algunos EPS, como es el caso de VPS y Pel, anteriormente mencionados, y celulosa en *P. putiida* KT2240 (Krasteva et al., 2010; Matsuyama et al., 2016; Xiao et al., 2016). Además, hemos observado que efectivamente los niveles de c-di-GMP se encuentran incrementados en la cepa Δ *mucG*. Como anteriormente se mencionó, FleQ es un regulador transcripcional que cuando une al segundo mensajero activa la transcripción de los genes biosintéticos del polisacárido Pel. Por otro lado, FleQ es principalmente conocido por ser el regulador maestro de los genes flagelares en *P. aeruginosa* (Arora et al., 1997; Ha and O'Toole, 2015). En *A. vinelandii* este regulador ya se ha estudiado, con el interés de relacionarlo con la motilidad por su relación con los genes del flagelo. Además, *A. vinelandii* posee también el regulador FlhDC que es el regulador de los genes flagelares en *E. coli*. Por ello, en un trabajo previo desarrollado por León y Espín se estudiaron estos genes (*fleQ* y *flhDC*) para definir cuál de los dos estaba involucrado con la motilidad y encontraron que es FlhDC, y no FleQ, quien regula los genes flagelares; dado que una mutante *flhDC* pierde sus flagelos. Por otro lado, la mutante *fleQ* no está afectada en motilidad y presenta sus flagelos como la cepa silvestre, vistos por microscopía electrónica (León and Espín, 2008). Este es un resultado inesperado dada la cercanía filogenética entre *A. vinelandii* y las *Pseudomonas spp.* Es importante mencionar que en este

trabajo de León y Espín, el efecto de las mutaciones en *flhDC* y *fleQ* solo se analizaron con respecto a la motilidad tipo nado y su relación con la producción de alginato no fue abordado. Además de que se estudió la cepa silvestre anteriormente mencionada ATCC 9046. Debido a esto, construimos la mutante *fleQ* en el fondo silvestre AEIV para determinar si esta involucrada con la síntesis de alginato. Previo a la construcción de la mutante, hicimos una búsqueda de los posibles blancos de regulación directos de FleQ en las regiones reguladoras de los genes de *A. vinelandii*, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En esta búsqueda encontramos que la región reguladora de *algD*, así como el gen que codifica para la DGC *AvGReg* (*Avin_00420*) poseen posibles sitios de pegado de FleQ (Anexo 1). La mutante *fleQ* mostró un fenotipo de sobreproducción de alginato como se puede observar en la Figura 22, sugiriendo que FleQ es un regulador negativo del proceso de biosíntesis de alginato, ya sea reprimiendo la expresión de *algD* y/o la de *AvGReg*.

El presente año se reportó que el regulador *AmrZ* es necesario para el proceso de biosíntesis de alginato debido a que la mutante en este gen no produce el polímero, siendo el primer reporte que relaciona *AmrZ* con el proceso de alginato en *A. vinelandii* (Mærk et al., 2020). En este trabajo de doctorado, también se construyó la mutante en *amrZ* porque ya se sabía que regulaba el alginato en *P. aeruginosa* (Baynham and Wozniak, 1996; Xu et al., 2016) y no había sido estudiado en *A. vinelandii*. Sin embargo, no se ha reportado que este regulador, así como ninguno de los anteriormente mencionados (*AlgU*, *GacS/GacA*, *RsmA*, *RpoS*, *AlgB* y *AlgR*), una al c-di-GMP. El efecto de la mutación en el gen *amrZ* en la cepa AEIV coincide con lo reportado por Mærk y colaboradores a inicios del año 2020. Como se puede apreciar en la Figura 22, la ausencia de *AmrZ* abate completamente la producción de alginato. Este resultado nos indica que *AmrZ* es un regulador positivo y esencial para la producción de alginato.

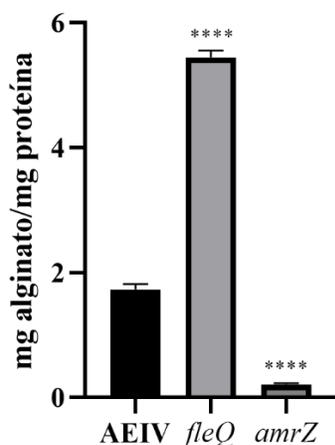


Figura 22. FleQ y AmrZ son reguladores de la producción de alginato. Cuantificación de alginato de las cepas silvestre AEIV y sus derivadas mutantes *fleQ* y *amrZ*. Se muestran las barras de desviación estándar de 3 experimentos

independiente. Se utilizó un análisis de t-student para determinar diferencias significativas. La significancia estadística está indicada (****p<0.0001).

6.10 Efecto del c-di-GMP en la motilidad tipo nado y formación de biopelículas en *A. vinelandii*

Dos de los procesos que son regulados por el c-di-GMP son la formación de biopelículas y motilidad. De manera general, se asocian concentraciones elevadas de c-di-GMP con la formación de biopelículas o estado sésil de las bacterias, y contrariamente bajos niveles con células móviles o estado planctónico (Boyd and O'Toole, 2012; Ha and O'Toole, 2015). Para evaluar si estos procesos se relacionan de igual manera con el c-di-GMP en nuestro modelo de estudio *A. vinelandii*, determinamos el comportamiento de las cepas AEIV y DGC+ en condiciones de formación de biopelículas y motilidad. Como se esperaba, altos niveles de c-di-GMP disminuyen en su totalidad la motilidad tipo nado en cajas de agar suave e incrementa la formación de biopelícula (Figura 23). A las 24 y 48 h la formación de biopelícula de la cepa DGC+ se incrementó 3 veces con respecto a la silvestre AEIV (Figura 23).

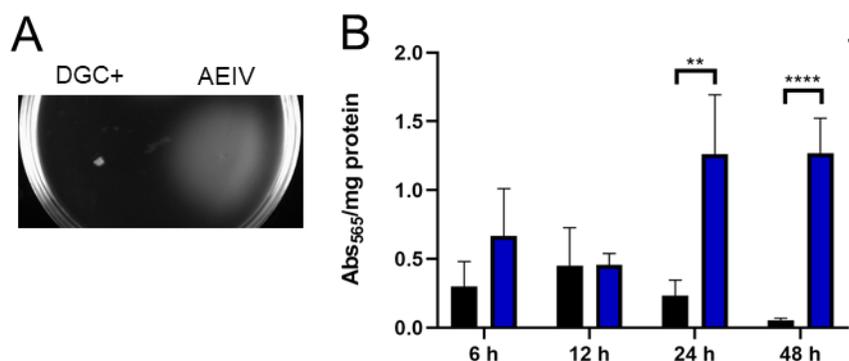


Figura 23. Efecto de elevados niveles de c-di-GMP sobre la motilidad tipo swimming y formación de biofilm. (A) Motilidad de la cepa AEIV y su derivada que sobre-produce AvGReg (DGC+) en agar suave después de 24 de incubación. (B) Cuantificación de biofilm formado en placas de 24-pozos de poliestireno por las cepas AEIV (barras negras) y DGC+ (barras azules) después de incubarse a 30 °C a los tiempos indicados. Se muestran las barras de desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se analizaron por pruebas t-student. La significancia estadística es indicada (**p<0.01 o ****p<0.0001).

7 DISCUSIÓN

7.1 El c-di-GMP regula la formación de biopelículas y motilidad en *A. vinelandii*

Durante los últimos años el c-di-GMP ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que regula una gran cantidad de procesos en la célula bacteriana. Entre los más reconocidos se encuentran la formación de biopelículas en bacterias Gram-negativas como lo es *P. aeruginosa* (Ha and O'Toole, 2015). En general, un aumento en los niveles de c-di-GMP se asocia con un incremento en la formación de biopelículas e inhibición de la motilidad tipo nado (Ha and O'Toole, 2015). En *A. vinelandii*, se desconoce si el c-di-GMP regula la formación de biopelículas y la motilidad. En este trabajo encontramos que la regulación de estos dos procesos por el c-di-GMP coincide con el esquema general. Sin embargo, a pesar de la abundante información que existe en la literatura de los mecanismos por los cuales este segundo mensajero regula la formación de biopelículas y motilidad (Boyd and O'Toole, 2012; Ha and O'Toole, 2015; Wolfe and Visick, 2008) no se hizo ninguna investigación al respecto. Sería interesante determinar si el c-di-GMP regula la transcripción de los genes del flagelo, el correcto ensamble del flagelo, su correcta localización en la membrana, su liberación/expulsión de la membrana o el correcto funcionamiento del mismo, cada uno de estos procesos son regulados por el c-di-GMP en otras bacterias (Wolfe and Visick, 2008). Por otro lado, dada la variedad de DGC y PDE que posee *A. vinelandii*, es muy probable que el c-di-GMP este involucrado en la regulación de otros procesos en nuestro modelo, como podría ser la producción de PHB y/o de alquilresorcinoles. Hasta el momento sabemos, que el c-di-GMP en *A. vinelandii*, esta involucrado con la formación de biopelículas, motilidad y producción de alginato, así como también con la formación de quistes resistentes a la desecación, por los resultados generados en un proyecto paralelo a este en nuestro grupo de investigación (Martínez-Ortiz et al., 2020).

7.2 Módulo de control de c-di-GMP que regula el proceso de biosíntesis de alginato.

La secuenciación de genomas ha permitido la identificación de genes que codifican para DGC y PDE en los genomas bacterianos y se ha encontrado que estos genes son muy abundantes. *A. vinelandii* posee 26 genes que codifican para proteínas con dominio GGDEF/EAL/HD-GYP. De esta multiplicidad de DGCs y PDEs, surge la pregunta de cómo estas proteínas logran ser específicas de determinado proceso. Como se mencionó en la Introducción, el concepto de módulo de control por c-di-GMP, así como el secuestro temporal y funcional que sufren los módulos de control resuelven esta pregunta con respecto a la especificidad. En *P. aeruginosa*, se ha identificado a la proteína Alg44

como la proteína efectora que une al c-di-GMP por medio de su dominio PilZ y que al unir c-di-GMP estimula la producción de alginato (Merighi et al., 2007; Moradali et al., 2017). Posteriormente, se identificó la proteína MucR como la DGC que sintetiza el c-di-GMP en las cercanías del dominio PilZ de Alg44, dado que en una mutante *mucR* se abatió la producción de alginato y la introducción de un plásmido que expresa *mucR* en la cepa silvestre aumentó la producción del polímero (Hay et al., 2009). Debido a que el complejo polimeraza Alg8-Alg44 y la DGC MucR se encuentran localizadas en la membrana interna, se sugiere un efecto local del c-di-GMP sintetizado por MucR sobre el complejo Alg8-Alg44. *A. vinelandii* codifica para un gen ortólogo de *mucR*, sin embargo, encontramos que MucR no es necesaria para la producción de alginato en *A. vinelandii*. En nuestro caso, hemos identificado a la DGC AvGreg y la PDE MucG como parte del módulo de control por c-di-GMP que regula la producción de alginato en *A. vinelandii*, además de controlar el PM del polímero. Haciendo una comparación entre los módulos de control de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii*, encontramos que la PDE MucG no se encuentra en *P. aeruginosa*, hasta el momento se desconoce la identidad de esta PDE en *P. aeruginosa*. Por otro lado, la sobre-producción de la DGC AvGReg estimula la producción de alginato pero su inactivación no abate la producción de alginato como si sucede con *mucR* en *P. aeruginosa*. Este resultado sugiere que el c-di-GMP sintetizado por otras DGCs puede activar al complejo Alg8-Alg44. Debido a que las mutaciones en los genes de otras DGCs de *A. vinelandii* no tuvieron ningún efecto sobre la producción de alginato, coloca a la DGC AvGReg como la DGC que mas contribuye a la poza de c-di-GMP necesaria para el proceso de síntesis de alginato. A diferencia de la proteína MucR, AvGReg no posee un dominio o hélice transmembranal que la localice en la membrana interna, pero la formación de un complejo por medio de la interacción de los dominios citosólicos de MucG, con AvGReg y el dominio PilZ de Alg44 resolvería el problema de la colocalización.

Estos resultados nos permiten proponer un modelo de regulación de la producción de alginato por la DGC AvGReg y la PDE MucG (Figura 24). Dado que existe un alto grado de conservación entre Alg44 de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* creemos que esta proteína funciona como el efector de c-di-GMP involucrado en la síntesis de alginato en *A. vinelandii*, completando así el módulo propuesto por la DGC AvGreg, la PDE MucG y como efector el dominio PilZ de Alg44 que interacciona con la glicosiltransferasa Alg8.

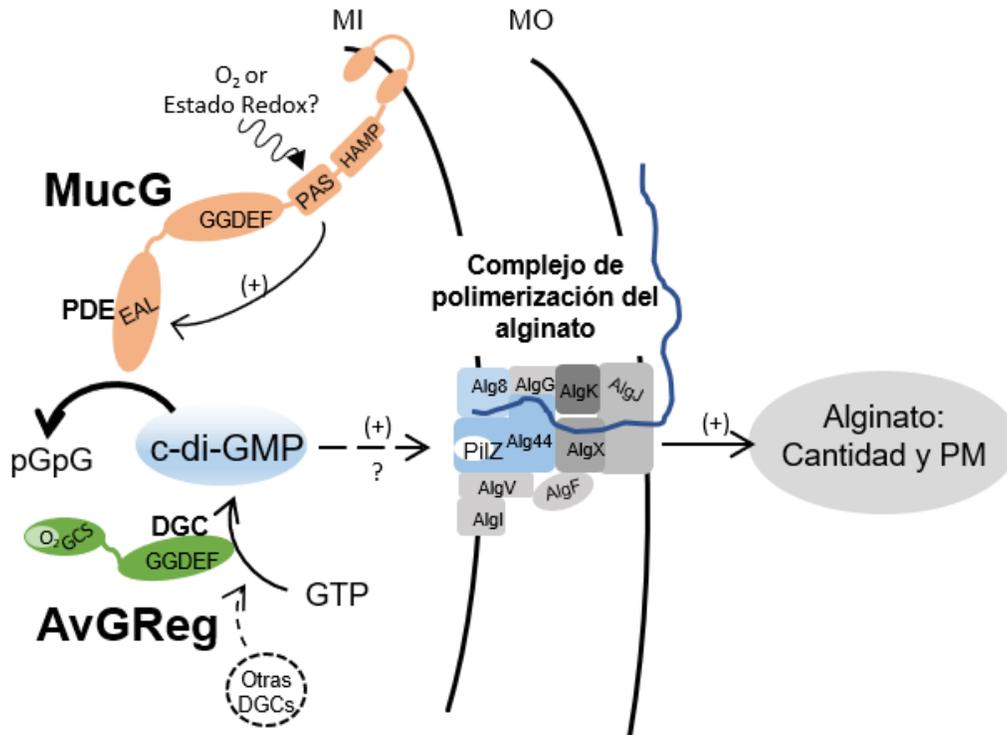


Figura 24. Modelo propuesto de regulación del proceso de biosíntesis de alginato por el módulo de control de c-di-GMP identificado en este trabajo. Los niveles de c-di-GMP necesarios para activar el complejo Alg8-Alg44 son controlados por la actividad de síntesis de la DGC AvGReg y degradados por la PDE MucG. Sin embargo, el papel que juega MucG controlando los niveles del c-di-GMP es fundamental, ya que en ausencia de AvGReg y MucG, la producción de alginato es activada inespecíficamente por otras DGC's.

Según nuestro modelo propuesto la DGC AvGReg proporciona la poza de c-di-GMP esencial para la síntesis de alginato, pero es la actividad de PDE de la proteína MucG quien juega el papel más importante reduciendo las pozas de c-di-GMP en las cercanías del dominio PilZ de Alg44. Esta hipótesis se apoya en el resultado de la doble mutante $\Delta mucG/\Delta AvGreg$ que no restableció los niveles silvestres de alginato en el fondo de la mutante $\Delta mucG$, en donde el dominio PilZ de Alg44 responde a los niveles globales de c-di-GMP de la célula sintetizados por otra(s) DGC(s) que inespecíficamente activan la producción del polímero.

7.3 El módulo de control responde a oxígeno o estado redox celular

La presencia del dominio PAS en MucG y el dominio sensor de globina en la DGC AvGReg sugiere que este módulo de control puede responder a oxígeno o al estado redox de la célula. La molécula de oxígeno ya ha sido reportada como una señal que detectan los dominios PAS o GCS de distintas DGCs y PDEs para modular su actividad enzimática. Por ejemplo, se han reportado las proteínas RmcA y RbdA cuya actividad PDE depende de sus dominios PAS. En el caso de RmcA su

actividad PDE es activada en condiciones oxidantes (Okegbe et al., 2017), mientras que para RbdA se propone que la unión del oxígeno a su dominio PAS inhibe su actividad PDE (An et al., 2010). También se ha descrito el caso de las proteínas DgcO y PdeO (inicialmente conocidas como DosC y DosP, respectivamente), que unen oxígeno por medio de su dominio GCS para el caso de la DgcO y la PdeO lo hace por medio de un dominio PAS (Tuckerman et al., 2009). Ambas proteínas, DgcO y PdeO, forman parte de un complejo multiproteico denominado degradosoma, junto con las proteínas RNasa E, proteína Rho y PNPasa, esta última es una proteína efectora de c-di-GMP cuya actividad es modulada por este segundo mensajero. Se propuso un modelo donde el procesamiento del RNA por este degradosoma es modulado por el c-di-GMP cuya concentración es controlada por la actividad de la DgcO y PdeO respondiendo al oxígeno (Figura 25), sin embargo, se desconoce cuales son los RNAs mensajeros blancos procesados por este degradosoma (Tuckerman et al., 2011).

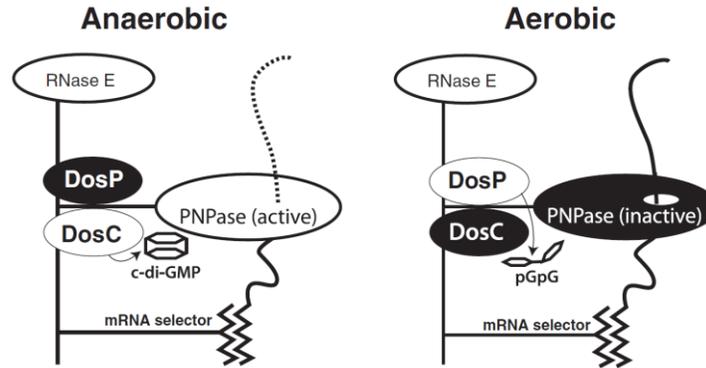


Figura 25. Modelo propuesto para la degradación de RNA dependiente de oxígeno por el degradosoma en *E. coli*. En condiciones anaerobias ambas proteínas, DgcO y PdeO, no unen oxígeno y la DGC DgcO sintetiza c-di-GMP para activar a la proteína PNPasa. De manera contraria, bajo condiciones aeróbicas se activa la PDE PdeO, degrada el c-di-GMP y se inactiva la PNPasa (Tuckerman et al., 2011)

Por otro lado, un caso mas similar a lo encontrado en este trabajo es el proceso de producción de celulosa, en *Komagataeibacter xylinus* (tambien conocida como *Acetobacter xylinum* y *Gluconacetobacter xylinus*), cuya síntesis es estimulada por el c-di-GMP donde las DGCs y PDEs involucradas en este proceso son reguladas por oxígeno. La DGC AxDGC2 posee un dominio PAS que une FAD como cofactor y cuando esta en su estado oxidado (altos niveles de oxígeno) promueve la actividad de síntesis de c-di-GMP. Por otro lado, la PDE AxpDEA1 posee un dominio PAS que une directamente oxígeno de tal manera que dicha unión inhibe la actividad de degradación del dominio de PDE (Chang et al., 2001; Qi et al., 2009). De tal manera que a concentraciones elevadas de oxígeno se promueve la actividad de DGC la proteína AxDGC2 y se inhibe la actividad PDE de la AxpDEA1; generando altos niveles de c-di-GMP y una alta producción de celulosa. De manera contraria, a bajos niveles de oxígeno, baja la producción de celulosa debido a una disminución en

los niveles de c-di-GMP porque se promueve la actividad PDE de AxPDEA1 (Qi et al., 2009)(Figura 26).

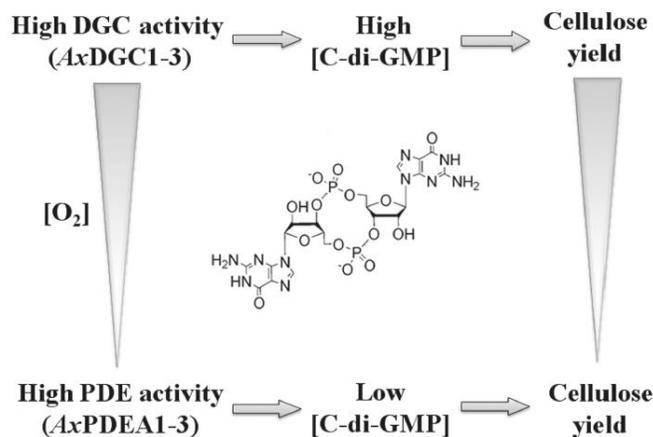


Figura 26. Esquema que muestra la relación de la concentración de oxígeno con la producción de celulosa que depende de los niveles de c-di-GMP, cuyos concentración es controlada por las DGC y PDE que responden a oxígeno a través de sus dominios PAS (Qi et al., 2009).

En el modelo de celulosa de *K. xylinus*, el incremento en los niveles de c-di-GMP se ven favorecidos por una elevada concentración de oxígeno. De manera contraria, en nuestro trabajo encontramos que los niveles de c-di-GMP se incrementan con una disminución en los niveles de oxígeno. Sin embargo, ambas duplas de proteínas, AxDGC2-AxPDEA1 y AvGReg-MucG, poseen dominios para responder a los niveles de oxígeno y tener un efecto directo en los niveles de c-di-GMP. Para el caso de la proteína AvGReg se demostró que su actividad es regulada por la unión directa de la molécula O_2 a su dominio de globina (Germani et al., 2019; Thijs et al., 2007). Cuando el oxígeno no está unido al dominio de globina la actividad de DGC se reduce hasta un 50%. Es importante mencionar, que su afinidad por el oxígeno es muy alta, una de las más altas entre los dominios GCS's caracterizados a la fecha, alrededor de 350 veces mayor que el dominio globina de la DGC DgcO de *E. coli* (0.04 vs 14 μ M) (Germani et al., 2019; Kitanishi et al., 2010). *A. vinelandii* es una bacteria fijadora de nitrógeno, con metabolismo estrictamente aerobio, por lo tanto, es posible que AvGReg esté activa bajo todas las condiciones de tensión de oxígeno que permiten el crecimiento de esta bacteria. Además, la alta afinidad de AvGReg por el O_2 podría estar asociada con la alta velocidad respiratoria de *A. vinelandii* que se ha propuesto sirve también para mantener unos niveles de oxígeno bajos para proteger la nitrogenasa (Setubal et al., 2009). Una hipótesis similar se ha propuesto para la DGC BpeGReg de *Bordetella pertussis*, una bacteria aerobia estricta que coloniza el tracto respiratorio superior. Se sugiere que la DGC BpeGReg permanece en un estado unido al oxígeno porque posee una constante de disociación baja de 0.64 μ M, 16 veces mayor que la constante

de disociación de AvGReg. MucG es una proteína multidominio que posee, además de los dominios GGDEF y EAL, un dominio HAMP y un dominio PAS. Se ha descrito que este último une al cofactor flavina mononucleótido (FMN), involucrado en la detección del estado redox intracelular (Ahumada-Manuel et al., 2017). Es posible que diferencias en el estado redox derivados de los distintos OTRs del medio de cultivo, sean detectados por el dominio PAS de MucG controlando así la actividad PDE de MucG, teniendo mayor actividad PDE cuando existen mayores concentraciones de oxígeno en el medio, similar a lo que pasa con el dominio PAS de la DGC AxDGC2 donde el estado oxidado del FAD en el dominio PAS promueve la actividad de síntesis de c-di-GMP. En el presente trabajo demostramos que la OTR_{max}, que previamente se mostró que afectaba el PM del alginato, afecta los niveles de c-di-GMP, que corelaciona con el PM observado. Basándonos en estas observaciones creemos que es muy importante determinar cuál es el papel del dominio PAS en la función de MucG.

Además, encontramos que la actividad PDE de MucG necesita de su dominio GGDEF intacto, ya que mutaciones en este dominio (*mucG^{GGAAF}*) mostró el mismo fenotipo de la cepa *mucG^{AAA}* (Figura 15). Ya se ha reportado este comportamiento para proteínas compuestas de este tipo GGDEF-EAL (Kuchma et al., 2007; Okegbe et al., 2017), incluso se destaca un papel regulatorio del dominio GGDEF, que es capaz de unir su sustrato GTP y activar el dominio de PDE, cuando se muta el dominio GGDEF este pierde su capacidad de unir GTP y se inactiva el dominio PDE (An et al., 2010; Christen et al., 2005; Kazmierczak et al., 2006; Mantoni et al., 2018). Por otro lado, se ha reportado que tanto los dominios GGDEF y EAL necesitan formar dímeros para ser activos, de tal manera que si se impide la dimerización de los dominios se afecta su actividad catalítica (Jenal et al., 2017; Sarenko et al., 2017). Se ha propuesto que la heterodimerización entre dominios GGDEF donde participa un dominio GGDEF conservado y uno degenerado inhibiría la actividad catalítica del dominio activo, así mismo, si las proteínas involucradas son proteínas híbridas (GGDEF-EAL), la heterodimerización por los dominios GGDEF podría controlar la actividad PDE del dominio EAL (Sarenko et al., 2017). Dado que las mutaciones en los dominios GGDEF degenerados de *A. vinelandii* no afectaron la producción de alginato, nos sugiere que la heterodimerización del dominio GGDEF de MucG con otros dominios GGDEF no modificaría su actividad de PDE. Sin embargo, la homodimerización podría ser necesaria para activar su dominio EAL, si esta homodimerización es dependiente de la unión del c-di-GMP en el sitio conservado GGDEF, explicaría porque al mutar los aminoácidos conservados en la cepa *mucG^{GGAAF}* se observa el mismo fenotipo que la cepa *mucG^{AAA}*.

7.4 Regulación transcripcional del proceso de biosíntesis de alginato por c-di-GMP

En los antecedentes se mencionó que la expresión del gen *algD*, gen que encabeza el grupo de genes que codifican para las proteínas necesarias para la síntesis de alginato, se encuentra aumentada en la cepa mutante $\Delta mucG$. Aquí hemos demostrado que esta cepa contiene niveles elevados del segundo mensajero, c-di-GMP, que podrían ser los responsables de este aumento en la transcripción, tal y como se ha descrito para los operones de otros EPS (Krasteva et al., 2010; Matsuyama et al., 2016). Hasta el momento desconocemos los niveles de transcripción de *algD* en la cepa $\Delta Avin_00420$ (*AvGReg⁻*), por lo tanto, no sabemos si la baja producción de alginato de esta cepa se deba a una baja transcripción de los genes biosintéticos o sea solo un efecto a nivel post-traducciona l debido los bajos niveles de c-di-GMP observados. Por otro lado, la producción de alginato en la doble mutante $\Delta mucG/\Delta Avin_00420$ sugiere que la transcripción de *algD* no está comprometida, sin embargo, desconocemos los niveles de c-di-GMP en esta doble mutante. Como hemos mencionado anteriormente, dado que MucG se encuentra ausente, los niveles de c-di-GMP pueden aumentar por acción de otras DGCs y estos activar la transcripción de *algD* en esta cepa, $\Delta mucG/\Delta Avin_00420$. Así mismo, ensayos de qRT-PCR para determinar los niveles de transcripción de *algD* en la cepa DGC+, que demostramos tiene 10 veces más c-di-GMP que la cepa silvestre AEIV, nos confirmaría y demostraría que el c-di-GMP afecta positivamente la transcripción de *algD*. Además, contamos con la cepa $\Delta mucG/PDE+$ que nos podría ayudar a saber si a esos niveles tan bajos de c-di-GMP ocurre la transcripción de *algD*.

Hasta el momento desconocemos el regulador a través del cual el c-di-GMP aumenta la transcripción de *algD*. Con respecto a los reguladores mencionados en la Introducción, se ha observado que estos regulan a nivel transcripcional y post-traducciona l genes que codifican para DGCs y PDEs en los modelos más estudiados. Hasta el momento, AlgB no se ha relacionado con los mecanismos de regulación que involucran al c-di-GMP. RpoS regula la transcripción de DGCs al entrar un cultivo de *E. coli* en fase estacionaria (Povolotsky and Hengge, 2012), hasta el momento desconocemos si existe alguna DGC y PDE cuya transcripción dependa de RpoS en *A. vinelandii*. De la misma manera, por medio de estudios de CHIP-Seq, se ha descrito a AmrZ y AlgR, como reguladores que controlan las pozas globales de c-di-GMP en *P. aeruginosa* al actuar como activadores y/o represores de DGCs y PDEs (Jones et al., 2014; Kong et al., 2015), así como también CsrA (homólogo de RsmA en *A. vinelandii*) regula la expresión proteínas relacionadas con el metabolismo del c-di-GMP a nivel post-transcripcional (Colley et al., 2016; Huertas-Rosales et al., 2017; Jonas et al., 2010, 2008; Lu et al., 2012). Con respecto al factor sigma AlgU, se sabe que regula directamente a AmrZ por lo tanto de manera indirecta también modula las pozas globales de c-di-

GMP (Tart et al., 2006). Sin embargo, una mutante en *mucA*, con una mayor actividad de AlgU, es no motil porque no presenta flagelos (León and Espín, 2008), la cepa $\Delta mucG$ presenta una motilidad un poco menor que la cepa silvestre (datos no mostrados), este efecto podría explicarse con un aumento en la actividad de AlgU, que a su vez explicaría el aumento en la transcripción de *algD* en la cepa $\Delta mucG$. También se ha descrito que AlgU y AlgR aumentan la expresión de RsmA en *P. aeruginosa* (Stacey et al., 2017; Stacey and Pritchett, 2016) pero al papel de esta proteína no se ha relacionado con la producción de alginato en *P. aeruginosa*, aun cuando unos estudios de microarreglos en un mutante *rsmA* mostraron una disminución en la expresión de los genes *alg* (Burrowes et al., 2006). Por otro lado, se reportó que la transcripción del pequeño RNA *rsmZ*, que antagoniza la actividad de *RsmA*, depende de los niveles de c-di-GMP (Burrowes et al., 2006). *A. vinelandii* codifica para 9 RNA pequeños pertenecientes a la familia RsmZ (Manzo et al., 2011), en un estudio desarrollado por Lopez-Pliego y colaboradores encontraron que los pequeños RNAs de la familia RsmZ se expresan de manera diferencial dependiendo de la fuente de carbono, demostrando que en determinadas condiciones un solo pequeño RNA puede expresarse mas que los otros miembros de la familia (López-Pliego et al., 2018), probablemente, alguno(s) de estos 9 pequeños RNA presenta una mayor transcripción en niveles altos de c-di-GMP, antagonizando a RsmA, explicando el aumento en los niveles del mensajero de *algD* observada en la mutante $\Delta mucG$.

Por otro lado, un candidato es el regulador FleQ, que ya se ha reportado que une al c-di-GMP para regular la transcripción de genes (Baraquet et al., 2012; Hickman and Harwood, 2008; Matsuyama et al., 2016; Xiao et al., 2016). Nuestros datos indican que FleQ es un regulador negativo del proceso de biosíntesis de alginato (Figura 22), además, dicha regulación podría ser directa sobre la transcripción de *algD* y/o el gen que codifica para la DGC *AvGreg* ya que ambos genes poseen sitios de pegado de FleQ. Sin embargo, se necesitan más experimentos para comprobar esta hipótesis

7.5 El c-di-GMP regula el PM del alginato en *A. vinelandii*

En este trabajo encontramos que cepas de *A. vinelandii* con niveles elevados de c-di-GMP sintetizan alginatos con mayor PM. En *P. aeruginosa*, se ha descrito que la polimerización del alginato esta ligada/acoplada con las reacciones que modifican al alginato, la acetilación y epimerización (Moradali et al., 2015). Estas modificaciones del alginato son llevadas por la epimerasa AlgG que epimeriza los residuos M a residuos G y la acetilaza AlgX que introduce grupos acetilo a los residuos M. *P. aeruginosa* sintetiza un alginato de elevado PM cuando se sustituye la epimerasa AlgG por una variante del AlgG inactiva; por otro lado, la sustitución de la acetilasa AlgX por una

variante inactiva promueve la síntesis de alginatos con un alto contenido de residuos G y es de bajo PM, indicando que la epimerización interfiere con la procesividad del complejo polimerasa Alg8-Alg44 (Moradali et al., 2015). Se sugiere que AlgG contribuye a la disminución de la longitud de la cadena de alginato ya que el mecanismo de reacción es muy similar al de las alginato liasas (Moradali et al., 2015). Sin embargo, este efecto de AlgG sobre el PM del alginato no sucede en *A. vinelandii*, ya que se ha reportado que la actividad epimerasa de AlgG de *A. vinelandii* es casi nula y son la familia de las C5 epimerasas AlgE1-7 las que se encargan de introducir los residuos G en el alginato sintetizado (Gimmestad et al., 2006). Por otro lado, las proteínas Alg8 y Alg44 de *A. vinelandii* poseen 81% y 62% de identidad, respectivamente, con sus homólogos de *P. aeruginosa*. Aun cuando los eventos de modificación del alginato y la procesividad del complejo polimerasa no parecen relacionarse de la misma manera como lo hacen en *P. aeruginosa*, creemos que la elevada disponibilidad del c-di-GMP se une al dominio PilZ de Alg44 y aumenta la procesividad complejo polimerasa Alg8-Alg44 permitiendo la síntesis de cadenas de alginato más largas. Ya se demostró en *P. aeruginosa* que la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de Alg44 no afecta su localización, su estabilidad ni las interacciones proteína- proteína de Alg44 con las proteínas Alg8, AlgK y AlgX que forman parte del sistema de secreción del alginato (Moradali et al., 2015). Sin embargo, ninguna de estas posibilidades ha sido explorada en *A. vinelandii*.

Por otro lado, en un mecanismo alternativo o complementario para explicar el aumento del PM con niveles elevados de c-di-GMP podrían estar involucradas las alginato liasas. *A. vinelandii* codifica para 6 alginato liasas. Solo se ha demostrado que AlgL contribuye a una disminución en el PM del alginato sintetizado en fase estacionaria (Trujillo-Roldán et al., 2003). Por otro lado, en un estudio realizado en la cepa silvestre AEIV de *A. vinelandii*, una posible relación entre las alginato liasas extracelulares (AlyA3 y AlgE7) y el PM del alginato se intuye. Se reportó que una mutante en el sistema EexDEF, un sistema de secreción tipo I y específico para la secreción de todas las AlgE(1-7) epimerasas, produce un alginato rico en ácidos manurónicos (>99%) y es de bajo PM (Gimmestad et al., 2006); pero cuando se agregan proteasas al medio de cultivo de la cepa Δ eexDEF el alginato aumenta su PM. Esto sugiere que en ausencia de la liasa-epimerasa AlgE7 (y todas la demás AlgE1-6 epimerasas) se continúa obteniendo un alginato de PM como el de la silvestre, producto de una actividad liasa extracelular muy probablemente AlyA3 que posee un péptido señal reconocido por los sistemas de secreción tipo I. Es probable que al agregar proteasas al medio de cultivo se elimina AlyA3, eliminando toda actividad liasa extracelular, y obteniendo alginato con PM elevado. Además, una mutante en *algE7* produce más alginato que la cepa silvestre AEIV, sin embargo el PM no fue estudiado en esta mutante (Gimmestad et al., 2009). Dado que existen un número creciente de

publicaciones que relacionan la regulación de los sistemas de secreción (I-VI) por el c-di-GMP (López-Baena et al., 2019), este segundo mensajero podría estar regulando la secreción de estas liasas a la superficie de *A. vinelandii* o por otro lado, podría ser un efecto a nivel de transcripción de los genes de las alginato liasas.

Estos resultados demuestran que el c-di-GMP regula el PM del alginato en *A. vinelandii*, uno de los parámetros que tiene un fuerte impacto en las propiedades físicas de los alginatos. Por otro lado, en un trabajo desarrollado en nuestro grupo de investigación y de manera paralela a este, se determinó cual era la función de la DGC MucR en *A. vinelandii*. Se encontró que, a diferencia de *P. eruginosa*, MucR no es necesaria para la producción de alginato pero si es necesaria para la formación de quistes resistentes a la desecación (Martínez-Ortiz et al., 2020). El quiste de *A. vinelandii* esta rodeado de dos capas, la intina y la exina, que están compuestas de alginatos de distintos contenidos de residuos M y G. La presencia de diferentes bloques de residuos M y G permiten la estructuración correcta de las capas de alginato y son esenciales para la protección del quiste y sobrevivir la desecación (Gimmestad et al., 2006; Hoidal et al., 2000). Estas diferencias de composición del alginato se deben a la actividad de las AlgE1-7 epimerasas y se determinó que la expresión de estas epimerasas requiere de la proteína MucR. Por tal motivo, el quiste de la mutante $\Delta mucR$ no contiene estas capas de alginato y no resiste la desecación, aún cuando produce alginato a niveles silvestres (Martínez-Ortiz et al., 2020). Integrando este resultado con los encontrados en este trabajo, podemos proponer que el c-di-GMP también regula las propiedades físicas de los alginatos sintetizados por *A. vinelandii*, dado que controla tanto la longitud de la cadena (PM) y su contenido de residuos M y G.

De manera similar a lo que encontramos en este trabajo, se reportó que la biogénesis del lipopolisacárido (LPS) O, la glicofoma antígeno O homopolimérica compuesta de residuos de ramnosa llamada Antígeno de Polisacárido Común (CPA), es regulada por la metiltransfera WarA cuya actividad se incrementa al unir c-di-GMP (McCarthy et al., 2017). WarA introduce un grupo metilo en la cadena nascente del LPS y termina su síntesis. Se demostró que en la mutante $\Delta warA$ se desregula la biogénesis del LPS, de tal manera que aumenta la longitud de las cadenas de LPS y de manera contraria, la sobre-producción de WarA generó cadenas de LPS mas cortas. Este trabajo demuestra que el c-di-GMP regula la biogénesis del LPS, no activando la glicosiltransferasa, sino regulando a WarA que se encarga de introducir la señal para terminar la síntesis del LPS, teniendo un impacto en la longitud de la cadena del LPS. La significancia biológica de la actividad de WarA es muy importante porque cepas con cadenas mas largas de LPS son menos patógenas que cepas portadoras de cadenas cortas de LPS (McCarthy et al., 2017).

En *A. vinelandii* la regulación de la composición de la cadena de alginato en términos de contenido de residuos M/G y PM, tiene un fuerte impacto en las propiedades viscoelásticas de los alginatos como se ha descrito en *P. aeruginosa* (Moradali et al., 2015). Considerando el hábitat natural de *A. vinelandii*, una bacteria del suelo, la regulación del PM del alginato y su contenido de residuos G promueve la formación de biopelículas donde alginatos con cadenas mas largas y de alto contenido de residuos G contribuyen a la estructuración de una biopelícula fuerte y estable manteniendo las células hidratadas y protegiéndolas del estrés ambiental. Por lo tanto, las proteínas MucG y AvGReg desempeñan un papel muy importante regulando la producción de alginato, así como sus propiedades físicas respondiendo a la disponibilidad de oxígeno de los diferentes hábitats en los que se encuentra *A. vinelandii*.

Desde el punto de vista biotecnológico la producción de alginatos de alto PM, mayor a 1 000 kDa, ha llamado mucho la atención por ser materiales biocompatibles con una gran capacidad de formar geles, una alta capacidad de retención de agua y por ser un material muy estable en condiciones fisiológicas, que lo convierten en un polisacárido muy utilizado en el campo biomédico como la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (Moradali and Rehm, 2020). En este trabajo encontramos que altas concentraciones de c-di-GMP promueven la síntesis de alginato de mayor PM, este hallazgo se suma al conocimiento existente para la producción de alginatos con composición definida y refuerza la idea de una producción comercial de alginatos a partir de *A. vinelandii*.

8. CONCLUSION

- El c-di-GMP es un efector positivo de la producción del exopolisacárido alginato, tal y como se ha descrito para otros exopolisacáridos. Mas allá de este hallazgo, el c-di-GMP también modula el PM del alginato, que es uno de los parámetros de gran interés dentro del campo biomédico para su uso como biomaterial. Las proteínas que forman parte del módulo de control por c-di-GMP que afectan la síntesis de alginato son la PDE MucG y la DGC AvGReg cuyas actividades, son reguladas por la disponibilidad de oxígeno. Para el caso de AvGReg se sabe que responde a O₂ por medio de su dominio GCS y MucG muy probablemente responda por medio de su dominio PAS. La regulación del PM del alginato debe tener una relevancia biológica importante dado que las diferencias fenotípicas entre las cepas silvestres AEIV y ATCC 9046 se atribuyen a diferencias en los niveles de c-di-GMP, que muy probablemente contribuyen a la adaptabilidad en el hábitat de donde fueron aisladas. Por ejemplo, modulando la motilidad tipo nado y la formación de biopelículas, procesos que también son regulados por el c-di-GMP en *A. vinelandii*. Además, los reguladores FleQ y AmrZ también pueden contribuir a la adaptabilidad de *A. vinelandii*, dado que son reguladores del proceso de biosíntesis de alginato, FleQ actuando negativamente y AmrZ de manera positiva.

9. PERSPECTIVAS

- 1.- Caracterizar el alginato de alto PM sintetizado por la cepa DGC+ en términos de composición, propiedades viscosificantes y formación de geles.
- 2.- Determinar el mecanismo por el cual el c-di-GMP regula el PM del alginato.
- 3.- Investigar el mecanismo por el cual los reguladores FleQ y AmrZ controlan el proceso de biosíntesis de alginato.
- 4.- Determinar si el c-di-GMP regula la transcripción de los genes *alg*.
- 5.- Identificar las DGCs y PDE involucradas con los procesos de formación de biopelículas y motilidad tipo nado.
- 6.- Investigar si el c-di-GMP afecta otros procesos en *A. vinelandii* como la producción de PHB y alquilresorsinoles.

10. REFERENCIAS

- Ahumada-Manuel CL, Guzmán J, Peña C, Quiroz-Rocha E, Espín G, Núñez C. 2017. The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**:1521–1534. doi:10.1007/s00253-016-7931-8
- Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP. 1995. Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**:63–67. doi:10.1016/0378-1119(95)00108-I
- Amikam D, Galperin MY. 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**:3–6. doi:10.1093/bioinformatics/bti739
- An S, Wu J, Zhang L-H. 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersal by a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase with a Putative Hypoxia-Sensing Domain. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:8160–8173. doi:10.1128/AEM.01233-10
- Anantharaman V, Aravind L. 2003. Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics* **4**:34. doi:10.1186/1471-2164-4-34
- Anantharaman V, Aravind L. 2001. The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**:579–582. doi:10.1016/S0968-0004(01)01968-5
- Anantharaman V, Aravind L. 2000. Cache – a signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **25**:535–537. doi:10.1016/S0968-0004(00)01672-8
- Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of Bacteriology* **179**:5574–5581. doi:10.1128/jb.179.17.5574-5581.1997
- Ayala JC, Wang H, Silva AJ, Benitez JA. 2015. Repression by H-NS of genes required for the biosynthesis of the *Vibrio cholerae* biofilm matrix is modulated by the second messenger cyclic diguanylic acid. *Molecular Microbiology* **97**:630–645. doi:https://doi.org/10.1111/mmi.13058
- Bakkevig K, Sletta H, Gimmetstad M, Aune R, Ertesvåg H, Degnes K, Christensen BE, Ellingsen TE, Valla S. 2005. Role of the *Pseudomonas fluorescens* Alginate Lyase (AlgL) in Clearing the Perioplasm of Alginates Not Exported to the Extracellular Environment. *Journal of Bacteriology* **187**:8375–8384. doi:10.1128/JB.187.24.8375-8384.2005

- Baraquet C, Harwood CS. 2016. FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **198**:178–186. doi:10.1128/JB.00539-15
- Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS. 2012. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40**:7207–7218. doi:10.1093/nar/gks384
- Baynham PJ, Wozniak DJ. 1996. Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription. *Molecular Microbiology* **22**:97–108. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02659.x
- Bellini D, Caly DL, McCarthy Y, Bumann M, An S-Q, Dow JM, Ryan RP, Walsh MA. 2014. Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Molecular Microbiology* **91**:26–38. doi:10.1111/mmi.12447
- Boyd CD, O'Toole GA. 2012. Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-di-GMP Effector Systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**:439–462. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155705
- Burrowes E, Baysse C, Adams C, O'Gara F. 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, **152**:405–418. doi:10.1099/mic.0.28324-0
- Castañeda M, Guzmán J, Moreno S, Espín G. 2000. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **182**:2624–2628. doi:10.1128/JB.182.9.2624-2628.2000
- Chang AL, Tuckerman JR, Gonzalez G, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M, Gilles-Gonzalez M-A. 2001. Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry* **40**:3420–3426. doi:10.1021/bi0100236
- Chen L-H, Köseoğlu VK, Güvener ZT, Myers-Morales T, Reed JM, D'Orazio SEF, Miller KW, Gomelsky M. 2014. Cyclic di-GMP-dependent Signaling Pathways in the Pathogenic Firmicute *Listeria monocytogenes*. *PLOS Pathogens* **10**:e1004301. doi:10.1371/journal.ppat.1004301
- Chou S-H, Galperin MY. 2016. Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *Journal of Bacteriology* **198**:32–46. doi:10.1128/JB.00333-15

- Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U. 2005. Identification and Characterization of a Cyclic di-GMP-specific Phosphodiesterase and Its Allosteric Control by GTP. *J Biol Chem* **280**:30829–30837. doi:10.1074/jbc.M504429200
- Cocotl-Yañez M, Moreno S, Encarnación S, López-Pliego L, Castañeda M, Espín G. 2014. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, **160**:479–487. doi:10.1099/mic.0.073353-0
- Cohen D, Mechold U, Nevenzal H, Yarmiyhu Y, Randall TE, Bay DC, Rich JD, Parsek MR, Kaever V, Harrison JJ, Banin E. 2015. Oligoribonuclease is a central feature of cyclic diguanylate signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **112**:11359–11364. doi:10.1073/pnas.1421450112
- Colley B, Dederer V, Carnell M, Kjelleberg S, Rice SA, Klebensberger J. 2016. SiaA/D Interconnects c-di-GMP and RsmA Signaling to Coordinate Cellular Aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* in Response to Environmental Conditions. *Front Microbiol* **7**. doi:10.3389/fmicb.2016.00179
- Dahlstrom KM, O’Toole GA. 2017. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annu Rev Microbiol* **71**:179–195. doi:10.1146/annurev-micro-090816-093325
- Dhamecha D, Movsas R, Sano U, Menon JU. 2019. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. *International Journal of Pharmaceutics* **569**:118627. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118627
- Díaz-Barrera A, Peña C, Galindo E. 2007. The oxygen transfer rate influences the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:903–910. doi:10.1007/s00253-007-1060-3
- Díaz-Barrera A, Silva P, Ávalos R, Acevedo F. 2009. Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O₂ transfer rate in chemostat cultures. *Biotechnol Lett* **31**:825–829. doi:10.1007/s10529-009-9949-9
- Fellay R, Frey J, Krisch H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**:147–154. doi:10.1016/0378-1119(87)90041-2
- Flores C, Díaz-Barrera Á, Martínez F, Galindo E, Peña C. 2014. Role of oxygen in the polymerization and de-polymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **90**:356–365.
- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* **2**. doi:10.3389/fmicb.2011.00167

- Galperin MY. 2004. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective†. *Environmental Microbiology* **6**:552–567. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x
- Galperin MY, Gaidenko TA, Mulkidjanian AY, Nakano M, Price CW. 2001. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiology Letters* **205**:17–23. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10919.x
- García A, Castillo T, Ramos D, Ahumada-Manuel CL, Núñez C, Galindo E, Büchs J, Peña C. 2020. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Biotechnology Reports* **26**:e00436. doi:10.1016/j.btre.2020.e00436
- Germani F, Nardini M, De Schutter A, Cuypers B, Berghmans H, Van Hauwaert M-L, Bruno S, Mozzarelli A, Moens L, Van Doorslaer S, Bolognesi M, Pesce A, Dewilde S. 2019. Structural and Functional Characterization of the Globin-Coupled Sensors of *Azotobacter vinelandii* and *Bordetella pertussis*. *Antioxidants & Redox Signaling* **32**:378–395. doi:10.1089/ars.2018.7690
- Gimmestad M, Ertesvåg H, Heggeset TMB, Aarstad O, Svanem BIG, Valla S. 2009. Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination. *Journal of Bacteriology* **191**:4845–4853. doi:10.1128/JB.00455-09
- Gimmestad M, Steigedal M, Ertesvåg H, Moreno S, Christensen BE, Espín G, Valla S. 2006. Identification and Characterization of an *Azotobacter vinelandii* Type I Secretion System Responsible for Export of the AlgE-Type Mannuronan C-5-Epimerases. *Journal of Bacteriology* **188**:5551–5560. doi:10.1128/JB.00236-06
- Ha D-G, O'Toole GA. 2015. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiology Spectrum* **3**. doi:10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557–580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Hay ID, Rehman ZU, Moradali MF, Wang Y, Rehm BHA. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology* **6**:637–650. doi:10.1111/1751-7915.12076
- Hay ID, Remminghorst U, Rehm BHA. 2009. MucR, a Novel Membrane-Associated Regulator of Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1110–1120. doi:10.1128/AEM.02416-08

- Hay ID, Wang Y, Moradali MF, Rehman ZU, Rehm BHA. 2014. Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology* **16**:2997–3011. doi:10.1111/1462-2920.12389
- Hengge R. 2016. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**:20150498. doi:10.1098/rstb.2015.0498
- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**:263–273. doi:10.1038/nrmicro2109
- Hernández RM, Orive G, Murua A, Pedraz JL. 2010. Microcapsules and microcarriers for *in situ* cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, Therapeutic Cell Delivery for In Situ Regenerative Medicine* **62**:711–730. doi:10.1016/j.addr.2010.02.004
- Hernandez-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millan LF, Espín G. 2012. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, **158**:1953–1963. doi:10.1099/mic.0.059329-0
- Hickman JW, Harwood CS. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology* **69**:376–389. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x
- Hoidal HK, Svanem BIG, Gimmestad M, Valla S. 2000. Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. *Environ Microbiol* **2**:27–38. doi:10.1046/j.1462-2920.2000.00074.x
- Huertas-Rosales Ó, Romero M, Heeb S, Espinosa-Urgel M, Cámara M, Ramos-González MI. 2017. The *Pseudomonas putida* CsrA/RsmA homologues negatively affect c-di-GMP pools and biofilm formation through the GGDEF/EAL response regulator CfcR. *Environmental Microbiology* **19**:3551–3566. doi:10.1111/1462-2920.13848
- Jenal U, Reinders A, Lori C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology* **15**:271–284. doi:10.1038/nrmicro.2016.190
- Jonas K, Edwards AN, Ahmad I, Romeo T, Römling U, Melefors Ö. 2010. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environmental Microbiology* **12**:524–540. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02097.x
- Jonas K, Edwards AN, Simm R, Romeo T, Römling U, Melefors Ö. 2008. The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology* **70**:236–257. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06411.x

- Jones CJ, Newsom D, Kelly B, Irie Y, Jennings LK, Xu B, Limoli DH, Harrison JJ, Parsek MR, White P, Wozniak DJ. 2014. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens* **10**:e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
- Kazmierczak BI, Lebron MB, Murray TS. 2006. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **60**:1026–1043. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05156.x
- Kitanishi K, Kobayashi K, Kawamura Y, Ishigami I, Ogura T, Nakajima K, Igarashi J, Tanaka A, Shimizu T. 2010. Important Roles of Tyr43 at the Putative Heme Distal Side in the Oxygen Recognition and Stability of the Fe(II)–O₂ Complex of YddV, a Globin-Coupled Heme-Based Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase. *Biochemistry* **49**:10381–10393. doi:10.1021/bi100733q
- Knutson CA, Jeanes A. 1968. A new modification of the carbazole analysis: Application to heteropolysaccharides. *Analytical Biochemistry* **24**:470–481. doi:10.1016/0003-2697(68)90154-1
- Kong W, Zhao J, Kang H, Zhu M, Zhou T, Deng X, Liang H. 2015. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **43**:8268–8282. doi:10.1093/nar/gkv747
- Köseoğlu VK, Heiss C, Azadi P, Topchiy E, Güvener ZT, Lehmann TE, Miller KW, Gomelsky M. 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Molecular Microbiology* **96**:728–743. doi:10.1111/mmi.12966
- Krasteva PV, Fong JCN, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MVAS, Yildiz FH, Sondermann H. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT Regulates Matrix Production and Motility by Directly Sensing Cyclic di-GMP. *Science* **327**:866–868. doi:10.1126/science.1181185
- Kuchma SL, Brothers KM, Merritt JH, Liberati NT, Ausubel FM, O'Toole GA. 2007. BifA, a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase, Inversely Regulates Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* **189**:8165–8178. doi:10.1128/JB.00586-07
- Larsen B, Haug A. 1971. Biosynthesis of alginate: Part I. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydrate Research* **17**:287–296. doi:10.1016/S0008-6215(00)82536-7
- Lee KY, Mooney DJ. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* **37**:106–126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

- Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology* **65**:1474–1484. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
- Leech AJ, Sprinkle A, Wood L, Wozniak DJ, Ohman DE. 2008. The NtrC Family Regulator AlgB, Which Controls Alginate Biosynthesis in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, Binds Directly to the *algD* Promoter. *Journal of Bacteriology* **190**:581–589. doi:10.1128/JB.01307-07
- Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. 2005. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *The Journal of Immunology* **175**:7512–7518. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7512
- León R, Espín G. 2008. *flhDC*, but not *fleQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology*, **154**:1719–1728. doi:10.1099/mic.0.2008/017665-0
- López-Baena FJ, Vinardell JM, Medina C. 2019. Regulation of Protein Secretion Systems Mediated by Cyclic Diguanylate in Plant-Interacting Bacteria. *Front Microbiol* **10**. doi:10.3389/fmicb.2019.01289
- López-Pliego L, García-Ramírez L, Cruz-Gómez EA, Domínguez-Ojeda P, López-Pastrana A, Fuentes-Ramírez LE, Núñez C, Castañeda M. 2018. Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Biotechnol* **60**:670–680. doi:10.1007/s12033-018-0102-7
- Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B. 2014. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **306**:L591–L603. doi:10.1152/ajplung.00335.2013
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275.
- Lozano E, Galindo E, Peña CF. 2011. Oxygen transfer rate during the production of alginate by *Azotobacter vinelandii* under oxygen-limited and non oxygen-limited conditions. *Microb Cell Fact* **10**:1–12. doi:10.1186/1475-2859-10-13
- Lu X-H, An S-Q, Tang D-J, McCarthy Y, Tang J-L, Dow JM, Ryan RP. 2012. RsmA Regulates Biofilm Formation in *Xanthomonas campestris* through a Regulatory Network Involving Cyclic di-GMP and the Clp Transcription Factor. *PLOS ONE* **7**:e52646. doi:10.1371/journal.pone.0052646

- Ma S, Selvaraj U, Ohman DE, Quarless R, Hassett DJ, Wozniak DJ. 1998. Phosphorylation-Independent Activity of the Response Regulators AlgB and AlgR in Promoting Alginate Biosynthesis in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **180**:956–968.
- Mærk M, Jakobsen ØM, Sletta H, Klinkenberg G, Tøndervik A, Ellingsen TE, Valla S, Ertesvåg H. 2020. Identification of Regulatory Genes and Metabolic Processes Important for Alginate Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by Screening of a Transposon Insertion Mutant Library. *Front Bioeng Biotechnol* **7**. doi:10.3389/fbioe.2019.00475
- Mantoni F, Paiardini A, Brunotti P, D’Angelo C, Cervoni L, Paone A, Cappellacci L, Petrelli R, Ricciutelli M, Leoni L, Rampioni G, Arcovito A, Rinaldo S, Cutruzzolà F, Giardina G. 2018. Insights into the GTP-dependent allosteric control of c-di-GMP hydrolysis from the crystal structure of PA0575 protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* **285**:3815–3834. doi:10.1111/febs.14634
- Manzo J., Manzo Joaquín, Cocotl-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez VM, Bustillos R, Velásquez C, Goiz Y, Solís Y, López L, Fuentes LE, Nuñez C, Segura D, Espín G, Castañeda M. 2011. Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *MMB* **21**:147–159. doi:10.1159/000334244
- Martínez Ortiz IC. 2015. Estudio de la proteína MucR en la síntesis de alginato por *Azotobacter vinelandii*., Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas: Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Martínez-Ortiz IC, Ahumada-Manuel CL, Hsueh BY, Guzmán J, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Waters CM, Zamorano-Sánchez D, Espín G, Núñez C. 2020. Cyclic-di-GMP-mediated regulation of extracellular mannuronan C-5 epimerases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* doi:10.1128/JB.00135-20
- Martínez-Salazar JM, Moreno S, Nájera R, Boucher JC, Espín G, Soberón-Chávez G, Deretic V. 1996. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **178**:1800–1808. doi:10.1128/jb.178.7.1800-1808.1996
- Massie JP, Reynolds EL, Koestler BJ, Cong J-P, Agostoni M, Waters CM. 2012. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *PNAS* **109**:12746–12751. doi:10.1073/pnas.1115663109
- Matsuyama BY, Krasteva PV, Baraquet C, Harwood CS, Sondermann H, Navarro MVAS. 2016. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **113**:E209–E218. doi:10.1073/pnas.1523148113

- McCarthy RR, Mazon-Moya MJ, Moscoso JA, Hao Y, Lam JS, Bordi C, Mostowy S, Filloux A. 2017. Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion. *Nature Microbiology* **2**:1–10. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.27
- Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **65**:876–895. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05817.x
- Moradali MF, Donati I, Sims IM, Ghods S, Rehm BHA. 2015. Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **6**:e00453-15. doi:10.1128/mBio.00453-15
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. Activation Mechanism and Cellular Localization of Membrane-Anchored Alginate Polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **83**. doi:10.1128/AEM.03499-16
- Moradali MF, Rehm BHA. 2020. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nature Reviews Microbiology* **18**:195–210. doi:10.1038/s41579-019-0313-3
- Moreno S, Nájera R, Guzmán J, Soberón-Chávez G, Espín G. 1998. Role of Alternative ζ Factor AlgU in Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **180**:2766–2769.
- Morgan JLW, McNamara JT, Zimmer J. 2014. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**:489–496. doi:10.1038/nsmb.2803
- Noar JD, Bruno-Bárcena JM. 2018. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology* **164**:421–436. doi:10.1099/mic.0.000643
- Núñez C, León R, Guzmán J, Espín G, Soberón-Chávez G. 2000. Role of *Azotobacter vinelandii* *mucA* and *mucC* Gene Products in Alginate Production. *Journal of Bacteriology* **182**:6550–6556. doi:10.1128/JB.182.23.6550-6556.2000
- Núñez C, Moreno S, Soberón-Chávez G, Espín G. 1999. The *Azotobacter vinelandii* Response Regulator AlgR Is Essential for Cyst Formation. *Journal of Bacteriology* **181**:141–148.
- Okegbe C, Fields BL, Cole SJ, Beierschmitt C, Morgan CJ, Price-Whelan A, Stewart RC, Lee VT, Dietrich LEP. 2017. Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 201700264. doi:10.1073/pnas.1700264114
- Orr MW, Donaldson GP, Severin GB, Wang J, Sintim HO, Waters CM, Lee VT. 2015. Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa*

- that is required for cyclic-di-GMP turnover. *PNAS* **112**:E5048–E5057. doi:10.1073/pnas.1507245112
- Österberg S, Åberg A, Seitz MKH, Wolf-Watz M, Shingler V. 2013. Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology Reports* **5**:556–565. doi:10.1111/1758-2229.12045
- Peña C, Campos N, Galindo E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**:510–515. doi:10.1007/s002530051088
- Pérez-Mendoza D, Sanjuán J. 2016. Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Current Opinion in Microbiology, Cell regulation* **30**:36–43. doi:10.1016/j.mib.2015.12.004
- Povolotsky TL, Hengge R. 2012. ‘Life-style’ control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second messenger c-di-GMP. *Journal of Biotechnology, Genome-based Microbiology – From -omics Research to Systems and Synthetic Biology* **160**:10–16. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.12.024
- Qi Y, Rao F, Luo Z, Liang Z-X. 2009. A Flavin Cofactor-Binding PAS Domain Regulates c-di-GMP Synthesis in Ax DGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry* **48**:10275–10285. doi:10.1021/bi901121w
- Quiroz-Rocha E, Bonilla-Badía F, García-Aguilar V, López-Pliego L, Serrano-Román J, Cocotl-Yañez M, Guzmán J, Ahumada-Manuel CL, Muriel-Millán LF, Castañeda M, Espín G, Nuñez C. 2017. Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, **163**:1105–1115. doi:10.1099/mic.0.000457
- Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**:1–52. doi:10.1128/MMBR.00043-12
- Römling U, Simm R. 2009. Prevailing Concepts of c-di-GMP Signaling. *Bacterial Sensing and Signaling* **16**:161–181. doi:10.1159/000219379
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH, Benziman M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**:279–281. doi:10.1038/325279a0
- Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, Dow JM. 2006. Cyclic Di-GMP Signaling in Bacteria: Recent Advances and New Puzzles. *Journal of Bacteriology* **188**:8327–8334. doi:10.1128/JB.01079-06

- Sabra W, Zeng A-P, Deckwer W-D. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**:315–325. doi:10.1007/s002530100699
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual., 2da ed. Cold Spring Harbor, NY.
- Sarenko O, Klauck G, Wilke FM, Pfiffer V, Richter AM, Herbst S, Kaefer V, Hengge R. 2017. More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP—Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *mBio* **8**. doi:10.1128/mBio.01639-17
- Schirmer T. 2016. C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *Journal of Molecular Biology, Molecular Basis of Signal Transduction* **428**:3683–3701. doi:10.1016/j.jmb.2016.07.023
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG. 2004. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* **113**:274–284. doi:10.1172/JCI19874
- Segura D, Núñez C, Espín G. 2020. *Azotobacter* Cysts.ELS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470015902.a0000295.pub2
- Setubal JC, Santos P dos, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Mærk M, Miller NM, Norton S, O’Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D. 2009. Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes. *Journal of Bacteriology* **191**:4534–4545. doi:10.1128/JB.00504-09
- Stacey SD, Pritchett CL. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* AlgU Contributes to Posttranscriptional Activity by Increasing *rsmA* Expression in a mucA22 Strain. *Journal of Bacteriology* **198**:1812–1826. doi:10.1128/JB.00133-16
- Stacey SD, Williams DA, Pritchett CL. 2017. The *Pseudomonas aeruginosa* Two-Component Regulator AlgR Directly Activates *rsmA* Expression in a Phosphorylation-Independent Manner. *Journal of Bacteriology* **199**. doi:10.1128/JB.00048-17
- Steiner S, Lori C, Boehm A, Jenal U. 2013. Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein–protein interaction. *The EMBO Journal* **32**:354–368. doi:10.1038/emboj.2012.315

- Sundriyal A, Massa C, Samoray D, Zehender F, Sharpe T, Jenal U, Schirmer T. 2014. Inherent Regulation of EAL Domain-catalyzed Hydrolysis of Second Messenger Cyclic di-GMP. *J Biol Chem* **289**:6978–6990. doi:10.1074/jbc.M113.516195
- Tart AH, Blanks MJ, Wozniak DJ. 2006. The AlgT-Dependent Transcriptional Regulator AmrZ (AlgZ) Inhibits Flagellum Biosynthesis in Muroid, Nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates. *Journal of Bacteriology* **188**:6483–6489. doi:10.1128/JB.00636-06
- Tarutina M, Ryjenkov DA, Gomelsky M. 2006. An Unorthodox Bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* Involved in Turnover of the Second Messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**:34751–34758. doi:10.1074/jbc.M604819200
- Taylor BL, Zhulin IB. 1999. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:479–506.
- Thijs L, Vinck E, Bolli A, Trandafir F, Wan X, Hoogewijs D, Coletta M, Fago A, Weber RE, Doorslaer SV, Ascenzi P, Alam M, Moens L, Dewilde S. 2007. Characterization of a Globin-coupled Oxygen Sensor with a Gene-regulating Function. *J Biol Chem* **282**:37325–37340. doi:10.1074/jbc.M705541200
- Trujillo-Roldán M, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G. 2003. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:733–737. doi:10.1007/s00253-002-1173-7
- Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M-A. 2011. Cyclic di-GMP Activation of Polynucleotide Phosphorylase Signal-Dependent RNA Processing. *Journal of Molecular Biology* **407**:633–639. doi:10.1016/j.jmb.2011.02.019
- Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EHS, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez M-A. 2009. An Oxygen-Sensing Diguanylate Cyclase and Phosphodiesterase Couple for c-di-GMP Control. *Biochemistry* **48**:9764–9774. doi:10.1021/bi901409g
- Urtuvia V, Maturana N, Acevedo F, Peña C, Díaz-Barrera A. 2017. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol* **33**:198. doi:10.1007/s11274-017-2363-x
- Whitney JC, Howell PL. 2013. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* **21**:63–72. doi:10.1016/j.tim.2012.10.001
- Whitney JC, Whitfield GB, Marmont LS, Yip P, Neculai AM, Lobsanov YD, Robinson H, Ohman DE, Howell PL. 2015. Dimeric c-di-GMP Is Required for Post-translational Regulation of Alginate Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **290**:12451–12462. doi:10.1074/jbc.M115.645051

- Wolfe AJ, Visick KL. 2008. Get the Message Out: Cyclic-Di-GMP Regulates Multiple Levels of Flagellum-Based Motility. *Journal of Bacteriology* **190**:463–475. doi:10.1128/JB.01418-07
- Xiao Y, Nie H, Liu H, Luo X, Chen W, Huang Q. 2016. C-di-GMP regulates the expression of *lapA* and *bcs* operons via FleQ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports* **8**:659–666. doi:10.1111/1758-2229.12419
- Xu B, Soukup RJ, Jones CJ, Fishel R, Wozniak DJ. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* AmrZ Binds to Four Sites in the *algD* Promoter, Inducing DNA-AmrZ Complex Formation and Transcriptional Activation. *Journal of Bacteriology* **198**:2673–2681. doi:10.1128/JB.00259-16
- Zamorano-Sánchez D, Fong JCN, Kilic S, Erill I, Yildiz FH. 2015. Identification and Characterization of VpsR and VpsT Binding Sites in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **197**:1221–1235. doi:10.1128/JB.02439-14

ANEXO 1

Tabla 6. Genes identificados con motivos de unión del regulador AmrZ.
Se presentan los 100 genes con el p-value más pequeño.

Gen/locus_tag	Secuencia	p-value
<i>flgI</i>	CAGATCGCCATCA	5.20E-08
<i>ftsE</i>	CAGAACGCCATCA	1.70E-07
<i>eexD</i>	CAAATTGCCATCA	2.30E-07
Avin_13900	CAGATCGCCAGCA	3.80E-07
Avin_02410	CAGATCGCCAGCA	3.80E-07
<i>fusA</i>	CAGTTCGCCAGCA	3.80E-07
Avin_12760	CAGATTGCCAGCA	5.20E-07
<i>algD</i>	CAGTTTGCCAGCA	5.20E-07
Avin_50630	CAAAACGCCATCA	5.80E-07
Avin_21470	CAGATCGCCACCA	5.80E-07
Avin_51450	CACATCGCCAGCA	8.00E-07
Avin_42150	CAGTTGGCCAGCA	8.00E-07
<i>nifS</i>	CAGATGGCCAGCA	8.00E-07
Avin_21320	CAGATGGCCACCA	1.20E-06
Avin_14040	CAAATTGCCAGCA	1.20E-06
<i>argF</i>	CAAATTGCCAGCA	1.20E-06
Avin_11610	CAGATCGCCATCG	1.40E-06
<i>ispH</i>	CAGATTGCCATCG	1.60E-06
Avin_06030	CATATCGCCAGCA	1.60E-06
Avin_37620	CGGATCGCCATCA	2.10E-06
Avin_36580	CAAAGTGCCATCA	2.10E-06
Avin_36570	CAAAGTGCCATCA	2.10E-06
Avin_36560	CAAAGTGCCATCA	2.10E-06
<i>groES</i>	CCGATCGCCATCA	2.10E-06
<i>birA</i>	CACCTCGCCATCA	2.10E-06
Avin_23170	CTGATCGCCATCA	2.50E-06
Avin_36270	CAGTTGGCCATCG	2.90E-06
<i>shaD</i>	CTGTTCGCCATCA	2.90E-06

<i>shaC</i>	CTGTTCGCCATCA	2.90E-06
Avin_15070	CACTTCGCCACCA	2.90E-06
Avin_11600	CAAATAGCCATCA	2.90E-06
Avin_04720	CTGTTCGCCATCA	2.90E-06
<i>yggX</i>	CAGTTGGCCATCG	2.90E-06
<i>pirR</i>	CACAACGCCACCA	3.40E-06
Avin_47840	CACAACGCCACCA	3.40E-06
Avin_48220	CCCATCGCCATCA	3.40E-06
Avin_09670	CCAATTGCCATCA	3.40E-06
Avin_01760	CAGAATGCCACCA	3.40E-06
<i>prpB</i>	CAGTTCGCCGTC	3.90E-06
Avin_04730	CAGTTCGACATCA	3.90E-06
Avin_04720	CAGTTCGACATCA	3.90E-06
Avin_01490	CCGATGGCCATCA	3.90E-06
<i>smc</i>	CCGAACGCCATCA	4.60E-06
Avin_41390	CCTATTGCCATCA	4.60E-06
Avin_41380	CCTATTGCCATCA	4.60E-06
Avin_01840	TAGATCGCCAGCA	4.60E-06
<i>acoB</i>	CAGCAGGCCATCA	5.20E-06
Avin_41170	CAAATGGCCATTA	5.20E-06
I	CAGGACGCCATCA	5.20E-06
Avin_33000	CAATAGGCCACCA	5.20E-06
Avin_29120	CAGGTCGCCAGCA	5.20E-06
<i>pabC</i>	CAGCAGGCCATCA	5.20E-06
Avin_12030	CAGAGCGCCAGCA	5.20E-06
Avin_12010	CAGAGCGCCAGCA	5.20E-06
Avin_22890	CAAAACGCCATTA	6.00E-06
Avin_20340	CAGATCGCCAGCG	6.00E-06
Avin_43670	CACTTCGCCATCG	6.00E-06
Avin_34480	CACAAGGCCACCA	6.00E-06
<i>algZ</i>	CTAATTGCCAGCA	6.00E-06
Avin_60480	CTAATTGCCAGCA	6.00E-06

Avin_31010	CACTTCGCCATCG	6.00E-06
<i>flgB</i>	TACTTTGCCATCA	6.00E-06
<i>flgA</i>	TACTTTGCCATCA	6.00E-06
<i>phbC</i>	CAGTCCGCCATCA	6.00E-06
Avin_18210	CAAATTGCCAGTA	6.00E-06
Avin_18200	CAAATTGCCAGTA	6.00E-06
Avin_01790	CAGAGGGCCAGCA	7.00E-06
Avin_01780	CAGATGGCCGTCA	7.00E-06
<i>pcaR</i>	CGCATCGCCATCA	7.00E-06
Avin_34470	CCGATCGCCAGCA	7.00E-06
Avin_32100	CGGATCGCCAGCA	7.00E-06
<i>pdxJ</i>	TAGTTCGCCACCA	7.00E-06
<i>pilY1</i>	CCGATCGCCAGCA	7.00E-06
<i>dapB</i>	CAGTTCGCCACCG	8.10E-06
Avin_40950	CGGTTCGCCAGCA	8.10E-06
Avin_40930	CGGTTCGCCAGCA	8.10E-06
Avin_37410	TAGATGGCCAGCA	8.10E-06
FI	TAGATGGCCAGCA	8.10E-06
Avin_31850	CAGTTCGGCATCA	8.10E-06
<i>mucA</i>	CGCATTGCCATCA	8.10E-06
<i>thiE</i>	CTCTACGCCATCA	8.10E-06
Avin_07230	CATATGGCTATCA	8.10E-06
<i>zwf-4</i>	CAGTTCGCCATCC	8.10E-06
Avin_48900	CTGATCGCCAGCA	9.20E-06
<i>ksgA</i>	TACATCGCCAGCA	9.20E-06
Avin_45970	TAGTTGGCCAGCA	9.20E-06
Avin_39230	CGGAATGCCATCA	9.20E-06
Avin_39220	CGGAATGCCATCA	9.20E-06
Avin_65130	CAGTAGGCCAGCG	9.20E-06
Avin_24800	CTGATCGCCAGCA	9.20E-06
<i>cydA</i>	CAGTTCGCCATGA	9.20E-06
Avin_18480	CAGATCGCCATGA	9.20E-06

Avin_18470	CAGATCGCCATGA	9.20E-06
Avin_16000	CATATTGCCAGTA	9.20E-06
<i>rpoA</i>	CACAAGGCCATTA	9.20E-06
Avin_05970	TACATCGCCAGCA	9.20E-06
<i>gadh2</i>	CAGTAGGCCAGCG	9.20E-06
Avin_45590	CTCATGGCCATCA	1.10E-05
<i>purT</i>	CACAATGCCATTA	1.10E-05

Tabla 7. Genes identificados con motivos de unión del regulador FleQ. Se presentan los 100 genes con el p-value más pequeño.

Gen/locus_tag	Secuencia	p-value
Avin_05110	GTCAAAAAACCGAC	9.10E-08
<i>ompR</i>	GTCAAAAAACCGAC	9.10E-08
Avin_17870	GTTATTAGATTGAC	2.80E-07
Avin_00420	GTCGTTATATTGAC	4.10E-07
Avin_37690	GTCAAAAGATTGGC	7.50E-07
<i>algD</i>	GTCAATAAAATGTC	1.70E-06
Avin_16660	GTCATTAAATTGAG	1.90E-06
Avin_32020	GTCATTAAATTGAG	1.90E-06
Avin_32030	GTCATTAAATTGAG	1.90E-06
Avin_35200	GTCAATAGATTGAA	1.90E-06
<i>rpoD</i>	GTCGAAAAACTGTT	1.90E-06
<i>modA3</i>	GTCGAAAATCGAC	1.90E-06
Avin_16040	GTCACTATTTTGTC	2.10E-06
Avin_16050	GTCACTATTTTGTC	2.10E-06
Avin_16060	GTCACTATTTTGTC	2.10E-06
Avin_51880	GCCATAAAATTGAT	2.10E-06
<i>atpH</i>	GTCGAAAAACTGGC	3.20E-06
Avin_21990	GTCTAAATTTTGTC	4.80E-06
Avin_22000	GTCTAAATTTTGTC	4.80E-06
Avin_27160	GTCATTTGATCGAC	4.80E-06
Avin_31960	GTCGAAAAACTTAC	4.80E-06

Avin_51880	GTCTAAATAGCGAC	4.80E-06
Avin_21460	GTCAATAACCTGAT	5.30E-06
Avin_00420	GTCAATATAACGAC	5.80E-06
<i>accB</i>	GTCAAGAAACTGAT	5.80E-06
<i>modE</i>	GTCGTAAAAATGAC	6.40E-06
<i>modG</i>	GTCGTAAAAATGAC	6.40E-06
Avin_01370	GTGACAAAACCTGAC	7.10E-06
<i>nifH</i>	GTGACAAAACCTGAC	7.10E-06
Avin_07210	GTCATAAAAGTGCC	7.10E-06
Avin_07220	GTCATAAAAGTGCC	7.10E-06
Avin_15420	GTCAGTAAATCGAA	7.10E-06
Avin_15430	GTCAGTAAATCGAA	7.10E-06
Avin_15440	GTCAGTAAATCGAA	7.10E-06
Avin_18470	GTTAATAGTGTCAC	7.10E-06
Avin_27150	GTCAGTAAATCGAA	7.10E-06
Avin_29630	GTCTAGAAATTGTC	7.10E-06
<i>lapB</i>	CTCATAAATTTGAC	7.10E-06
<i>algE7</i>	GTCGGAAAACCTCAC	7.90E-06
Avin_35450	GTCGATAAAGCGTT	8.70E-06
Avin_49710	GTCGTACAACCTGAC	8.70E-06
Avin_09590	GTCAGAAGTTTTAC	9.50E-06
<i>pilD</i>	GCCAGAAGATCGAC	9.50E-06
<i>metG</i>	GTCAGTACTTCGAC	9.50E-06
<i>fucP</i>	GTCAATAGTTTTTC	1.00E-05
Avin_03610	GTCAATAGTTTTTC	1.00E-05
<i>zwf-2</i>	GTGAAAAAATTGTT	1.00E-05
<i>cspA</i>	GTCGAAAATTCCAC	1.00E-05
Avin_39190	GTCGAAAATTCCAC	1.00E-05
Avin_46200	GTCACATGATTGTT	1.00E-05
Avin_08290	GTCGGAAAACCTGGC	1.10E-05
<i>lrgA</i>	GTCGGAAAACCTGGC	1.10E-05
<i>cydR</i>	GTCAGTAACTGAG	1.10E-05

<i>ccoN</i>	GTCTCAAAACTGTT	1.10E-05
Avin_20020	GTCTCAAAACTGTT	1.10E-05
Avin_25460	GTCGGAAAAGTGTT	1.10E-05
<i>moeB2</i>	GTCATAAAACCGTA	1.30E-05
Avin_16360	GCTAAATAATTGAT	1.30E-05
Avin_24620	GTTAAATTATTGTT	1.30E-05
Avin_26730	GTCACATATCTCAC	1.30E-05
Avin_31690	GTCATATAAATGTC	1.30E-05
Avin_43060	GTTGATAAATTGGT	1.30E-05
<i>lctP</i>	GTTGATAAATTGGT	1.30E-05
Avin_52390	GGCAAATACTGAC	1.30E-05
<i>thiL</i>	GTCAAAGACCGAG	1.40E-05
Avin_18580	GTCGGAAAATCCAC	1.40E-05
<i>recO</i>	GTCACCAGAGTGAC	1.50E-05
Avin_16480	GTCAAAAAGCAAC	1.50E-05
<i>rnfE</i>	GTCGAAAGTTCCAC	1.50E-05
Avin_35250	GTCGGAAGACTGTT	1.50E-05
Avin_35260	GTCGGAAGACTGTT	1.50E-05
Avin_35270	GTCGGAAGACTGTT	1.50E-05
Avin_00770	GTCAGTATATCGAG	1.60E-05
Avin_01720	GACAAAATATTGTC	1.60E-05
Avin_16040	GACAAAATAGTGAC	1.60E-05
Avin_16050	GACAAAATAGTGAC	1.60E-05
Avin_16060	GACAAAATAGTGAC	1.60E-05
<i>cydR</i>	CTCAGTAACTGAC	1.60E-05
Avin_22180	GTCGATAGACTGCC	1.60E-05
<i>pykA-2</i>	GTCGATAGACTGCC	1.60E-05
<i>lpdA</i>	GCCAGAAGTTCGAC	1.60E-05
<i>ech</i>	GTCAATTAATTATT	1.80E-05
<i>ssuD</i>	GTCAGTAGTCCGGC	1.80E-05
<i>dctA-3</i>	GTGATATAATCGAC	1.80E-05
Avin_31220	GTGATATAATCGAC	1.80E-05

<i>oprE</i>	GCCAATAATTTTCAT	1.80E-05
Avin_31680	GCCAATAATTTTCAT	1.80E-05
Avin_41820	GTCACAATACTCAT	1.80E-05
Avin_41840	GTCACAATACTCAT	1.80E-05
<i>pilN</i>	GGCAGAAGATTGAC	1.80E-05
<i>anfH</i>	GTCGGTAAATTCTT	1.80E-05
<i>modC1</i>	GTCGAAAATTTGTA	1.80E-05
<i>metG</i>	GTCGAAGTACTGAC	2.00E-05
<i>ffh</i>	GTTATATAATTGCC	2.00E-05
Avin_39590	GTTATATAATTGCC	2.00E-05
Avin_43940	GTCGATAATTCCTC	2.00E-05
Avin_00770	CTCGATATACTGAC	2.20E-05
Avin_01910	CTCAATATATTGTT	2.20E-05
Avin_10590	GTCACAAAAC TTTC	2.20E-05
Avin_10600	GTCACAAAAC TTTC	2.20E-05

ANEXO 2, ARTÍCULO

Ahumada-Manuel CL, Martínez-Ortiz IC, Hsueh BY, Guzmán J, Waters CM, Zamorano-Sánchez D, Espín G, Núñez C. Increased c-di-GMP Levels Lead to the Production of Alginates of High Molecular Mass in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.* 2020 Nov 19;202(24):e00134-20. doi: 10.1128/JB.00134-20. PMID: 32989088; PMCID: PMC7685544.



Increased c-di-GMP Levels Lead to the Production of Alginates of High Molecular Mass in *Azotobacter vinelandii*

Carlos L. Ahumada-Manuel,^a Iliana C. Martínez-Ortiz,^a Brian Y. Hsueh,^b Josefina Guzmán,^a Christopher M. Waters,^b David Zamorano-Sánchez,^c Guadalupe Espín,^a  Cinthia Núñez^{a*}

^aDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^bDepartment of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

^cPrograma de Biología Sintética y Biología de Sistemas, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ABSTRACT *Azotobacter vinelandii* produces the linear exopolysaccharide alginate, a compound of significant biotechnological importance. The biosynthesis of alginate in *A. vinelandii* and *Pseudomonas aeruginosa* has several similarities but is regulated somewhat differently in the two microbes. Here, we show that the second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) regulates the production and the molecular mass of alginate in *A. vinelandii*. The hybrid protein MucG, containing conserved GGDEF and EAL domains and N-terminal HAMP and PAS domains, behaved as a c-di-GMP phosphodiesterase (PDE). This activity was found to negatively affect the amount and molecular mass of the polysaccharide formed. On the other hand, among the diguanylate cyclases (DGCs) present in *A. vinelandii*, AvGReg, a globin-coupled sensor (GCS) DGC that directly binds to oxygen, was identified as the main c-di-GMP-synthesizing contributor to alginate production. Overproduction of AvGReg in the parental strain phenocopied a $\Delta mucG$ strain with regard to alginate production and the molecular mass of the polymer. MucG was previously shown to prevent the synthesis of high-molecular-mass alginates in response to reduced oxygen transfer rates (OTRs). In this work, we show that cultures exposed to reduced OTRs accumulated higher levels of c-di-GMP; this finding strongly suggests that at least one of the molecular mechanisms involved in modulation of alginate production and molecular mass by oxygen depends on a c-di-GMP signaling module that includes the PAS domain-containing PDE MucG and the GCS DGC AvGReg.

IMPORTANCE c-di-GMP has been widely recognized for its essential role in the production of exopolysaccharides in bacteria, such as alginate produced by *Pseudomonas* and *Azotobacter* spp. This study reveals that the levels of c-di-GMP also affect the physical properties of alginate, favoring the production of high-molecular-mass alginates in response to lower OTRs. This finding opens up new alternatives for the design of tailor-made alginates for biotechnological applications.

KEYWORDS *Azotobacter*, c-di-GMP, alginate, MucG, molecular mass, oxygen transfer rate

Alginates are linear polysaccharides composed of variable proportions of (1–4)-linked β -D-mannuronic acid (M) and its C-5 epimer α -L-guluronic acid (G). This polymer is produced by brown algae and by bacteria of the genera *Azotobacter* and *Pseudomonas* (1). Bacterial alginates may be O-acetylated at some of the C-2 or C-3 carbons of the mannuronic acid residues (1). Alginates are important biopolymers with broad applications in the medical and industrial fields, where they are used as stabilizing, thickening, and gelling agents. Alginate microspheres have also been used in therapeutic delivery, releasing drugs, proteins, vaccines, and cells (2). It is well known that the properties of the polymer are determined by the ratio and distribution of M

Citation Ahumada-Manuel CL, Martínez-Ortiz IC, Hsueh BY, Guzmán J, Waters CM, Zamorano-Sánchez D, Espín G, Núñez C. 2020. Increased c-di-GMP levels lead to the production of alginates of high molecular mass in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 202:e00134-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00134-20>.

Editor Michael Y. Galperin, NCBI, NLM, National Institutes of Health

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Cinthia Núñez, cinthia@ibt.unam.mx.

* Present address: Cinthia Núñez, Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire, USA.

For a companion article on this topic, see <https://doi.org/10.1128/JB.00135-20>.

Received 12 March 2020

Accepted 23 September 2020

Accepted manuscript posted online 28 September 2020

Published 19 November 2020

and G residues, by the acetylation degree, and by the overall molecular mass of the polymer (1, 3). Currently, this polymer is manufactured from brown algae but, given the intrinsic variation in their composition, *Azotobacter vinelandii* has been proposed as a source for the production of tailor-made alginates (1).

In *Pseudomonas aeruginosa*, alginate acts as a virulence factor mediating the formation of biofilms, which provide a thick protective layer against host immune attacks and antimicrobials (4, 5); in *Azotobacter* species, which are free-living bacteria, alginate is produced in copious amounts during vegetative growth, where it may serve as a diffusion barrier against heavy metals and oxygen (6). This polymer is also produced during the developmental process of *A. vinelandii*, leading to the formation of dormant cells called cysts. These differentiated cells are surrounded by an alginate coat that is essential to resist harsh environmental conditions (6).

The alginate biosynthetic pathway is well conserved between the *Azotobacter* and *Pseudomonas* genera (1, 7). The activated cytosolic precursor GDP-mannose is polymerized to alginate in a synthase-dependent pathway by the action of the membrane-anchored glycosyltransferase Alg8 and the copolymerase Alg44. A multiprotein scaffold complex that is composed of 10 subunits and includes Alg8-Alg44 spans the cytoplasmic membrane, the periplasm, and the outer membrane and guides the nascent polymannuronate chain for secretion (1, 8, 9). Translocation of the nascent polymannuronate chain across the periplasm is coupled with modifications, such as O-acetylation (conducted by AlgX) and epimerization of β -D-mannuronic acid moieties (conducted by AlgG). A periplasmic alginate lyase (AlgL) forms part of the multiprotein scaffold complex and is necessary to degrade alginate chains that have been misguided into the periplasm or to degrade the nascent alginate chain (10, 11). In *A. vinelandii*, the secreted alginate is further modified by a family of extracellular mannuronan C-5 epimerases (AlgE1 to AlgE7), which introduce various amounts of α -L-guluronic acid residues in different patterns and distributions (12).

The molecular basis of polymer chain length determination in alginate is not totally understood. In *P. aeruginosa*, however, the process of alginate polymerization and the modification events (i.e., acetylation and epimerization) show a clear relationship. While the polymer acetylation rate directly correlates with the molecular mass, the rate of alginate epimerization by AlgG inversely correlates with the molecular mass of the alginate produced, presumably as a result of AlgG-mediated polymer degradation (9). Furthermore, it has been suggested that AlgG, as a scaffold subunit, might be critical for processivity of alginate polymerization. In *A. vinelandii*, it has been proposed that both the activity of the alginate polymerase complex Alg8-Alg44 and that of alginate lyases contribute to the polymer chain length of alginate (13). AlgL in *A. vinelandii* was shown to reduce the molecular mass of the alginate during vegetative growth at late stationary phase (14). In addition to AlgL, *A. vinelandii* contains five other alginate lyases (AlyA1, AlyA2, AlyA3, AlgE7, and AlyB), but their role in determining the alginate molecular mass has not been investigated (15). AlyA1 to AlyA3 belong to the PL7 family of alginate lyases. AlyA2 is necessary for normal growth in the laboratory, while AlyA1 is dispensable for growth. AlyA3 and AlgE7 are extracellular Ca^{2+} -dependent alginate lyases that are necessary for the rupture of the *A. vinelandii* cyst during germination and the release of the nascent alginate chain from the cell surface, respectively. AlyB is an exolyase whose function is still unknown (11, 15).

The biosynthesis of a great variety of exopolysaccharides is regulated at multiple levels by the ubiquitous second messenger bis(3',5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) (16, 17). c-di-GMP is produced from two GTP molecules by the action of diguanylate cyclases (DGCs) with a GGDEF domain and is degraded by the action of specialized c-di-GMP phosphodiesterases (PDEs) with either EAL or HD-GYP domains (18). Genomic analyses have shown that GGDEF and EAL domains can coexist in the same polypeptide chain and also may be fused to sensory domains such as PAS, GAF, and REC domains, among others. Therefore, the enzymatic activities of a particular DGC or PDE could be regulated by environmental signals (18, 19). To exert its function, c-di-GMP must bind to an effector/receptor component that is responsible for mounting a cellular response.

Several classes of c-di-GMP receptors have been reported and include transcription factors, riboswitches, degenerate GGDEF and EAL domains, and proteins containing a c-di-GMP-binding PilZ domain (18, 20).

Alginate polymerization in *P. aeruginosa* is regulated by c-di-GMP at the posttranslational level by allosteric binding to the PilZ domain of the copolymerase Alg44 (21, 22). The DGC MucR has been found to be the source for c-di-GMP-dependent regulation of Alg44 in *P. aeruginosa* (23). The molecular basis of the Alg8 activation mechanism upon binding of c-di-GMP to the PilZ domain of Alg44 was investigated (24). This mechanism does not involve the stabilization of the polymerase complex or its interaction with other scaffold subunits (i.e., AlgX, AlgG, or AlgK). Analysis of critical residues in Alg8 for the c-di-GMP-mediated activation of alginate polymerization suggests that such a mechanism is dissimilar from the autoinhibitory mechanism proposed for cellulose polymerization (24). To date, the effect of different levels of c-di-GMP on the molecular mass of the alginate has not been investigated.

A. vinelandii has orthologues of Alg44, which has a conserved PilZ domain (22), and of MucR, raising the question of whether c-di-GMP is involved in the regulation of alginate polymerization in this organism. Furthermore, we showed previously that a hybrid GGDEF-EAL protein named MucG, which is not present in *P. aeruginosa*, negatively controls *A. vinelandii* alginate production and molecular mass in response to the oxygen transfer rate (OTR) (25). All of these observations strongly suggest that c-di-GMP plays an important role in alginate biosynthesis in *A. vinelandii*, and the goal of this work was to investigate the molecular basis of this regulation.

Our results indicate that the mechanism by which MucG and the OTR modulate alginate biosynthesis and molecular mass in *A. vinelandii* involves c-di-GMP signaling. Artificially induced accumulation of c-di-GMP had effects on alginate biosynthesis similar to those of the absence of *mucG*. In contrast to what happens in *P. aeruginosa*, the absence of the MucR orthologue did not impair alginate production. Our results revealed that AvGReg, a GCS DGC, is the main contributor to c-di-GMP-dependent activation of alginate production in *A. vinelandii*.

RESULTS

MucG is an active c-di-GMP PDE. The GGDEF-EAL MucG protein Avin_07910 (GenBank accession number [AC077036](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC077036); also referred to as AVIN_RS03680) is implicated in determining the total amount and mean molecular mass of alginate, and these effects depend on the presence of an intact EAL domain (25). These observations strongly suggest that MucG has c-di-GMP PDE activity; however, this activity has not been demonstrated experimentally. To begin to address this point, we quantified c-di-GMP in the wild-type (WT) strain AEIV, a Δ *mucG* strain (CLAM04), and a strain with a mutated allele of *mucG* (*mucG^{AAA}*) in the chromosome that produces a MucG protein lacking conserved amino acids of the EAL catalytic site. The absence of MucG or the production of a putatively inactive version of MucG resulted in increased c-di-GMP accumulation, compared to the WT strain (Fig. 1A). Together, these results strongly suggest that MucG is an active PDE capable of modulating the abundance of c-di-GMP in *A. vinelandii*.

MucG is a hybrid protein containing both GGDEF and EAL conserved domains. To begin to address the contribution of the GGDEF domain of MucG to the intracellular c-di-GMP pool, we quantified c-di-GMP in a strain with a mutant *mucG* allele that produces a MucG variant with a GGAAF motif. These amino acid changes typically result in loss of DGC activity in GGDEF-containing enzymes. c-di-GMP accumulation in the *mucG^{GGAAF}* strain was greater than that in the WT strain, clearly suggesting that the GGDEF domain is required for the PDE activity of MucG. This result is not unprecedented, as in other GGDEF-EAL proteins the GGDEF domain modulates the PDE activity in response to the availability of GTP (26–28).

c-di-GMP levels are linked to the regulation of alginate abundance by MucG. Although c-di-GMP has been shown to control alginate production in *P. aeruginosa* (21, 23), its role in *A. vinelandii* has not been addressed previously. To determine the

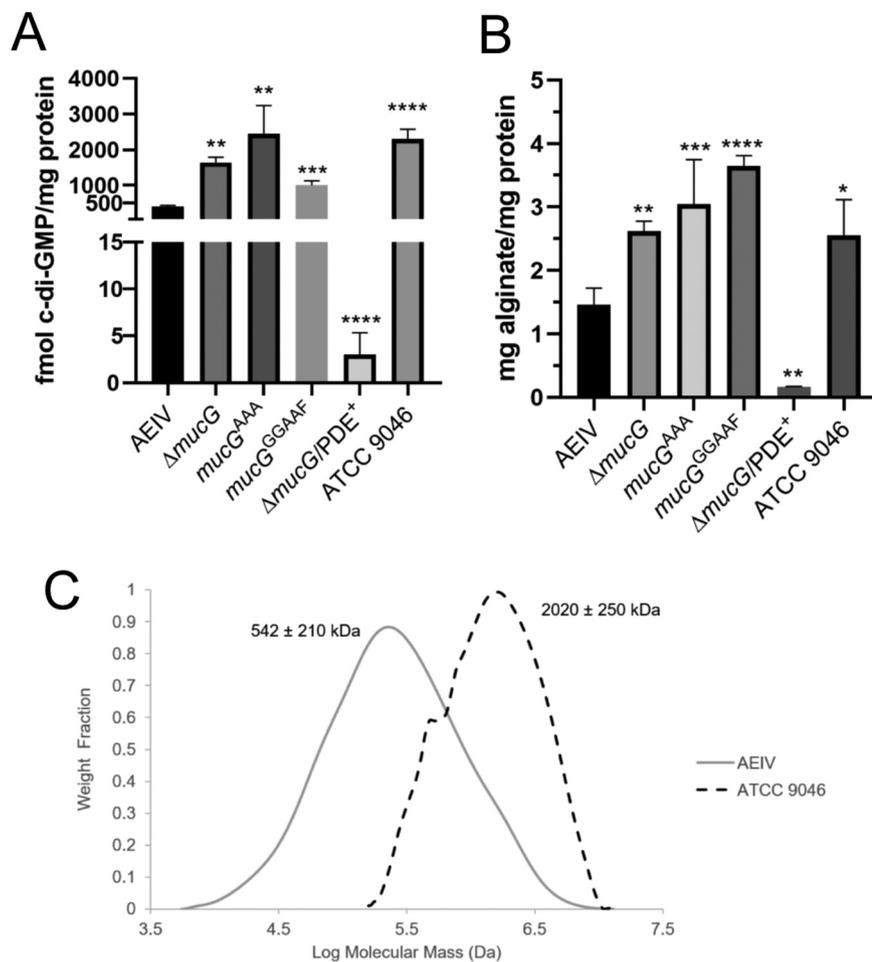


FIG 1 MucG negatively controls c-di-GMP accumulation and alginate production. (A) c-di-GMP quantification in the WT strain AEIV, in its derivative mutants CLAM04 ($\Delta mucG$), CLAM01 ($mucG^{AAA}$), CLAM05 ($\Delta mucG/PDE^+$), and CLAM06 ($mucG^{GGAAF}$), and in the alginate-overproducing strain ATCC 9046. (B) Alginate quantification in the same *A. vinelandii* strains used in panel A. Means and standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$. (C) Graphic showing the molecular mass distribution of the alginates produced by strains AEIV and ATCC 9046. A representative curve for each strain is shown. Cells were grown for 48 h in liquid Burk's-sucrose medium.

importance of the cellular concentration of c-di-GMP for alginate production in the $\Delta mucG$ strain, we analyzed the effect of the overproduction of a putative *A. vinelandii* PDE (Avin_50640 [GenBank accession number [AC081152](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AC081152)], also referred to as AVIN_RS23150). Avin_50640 has a HD-GYP domain with conserved catalytic residues with respect to that of the active PDE PmGH from *Persephonella marina* (29). Overproduction of Avin_50640 in the $\Delta mucG$ strain ($\Delta mucG/PDE$) resulted in severely reduced c-di-GMP levels, compared to both the WT strain and the $\Delta mucG$ strain (Fig. 1A). While alginate levels were higher in the $\Delta mucG$, $mucG^{AAA}$, and $mucG^{GGAAF}$ strains, compared to the WT strain, the production of this polymer was negligible in the $\Delta mucG$ strain overproducing Avin_50640 (Fig. 1B). These results indicate that increased alginate accumulation in the $\Delta mucG$ strain can be suppressed by ectopically expressing an active PDE.

The *A. vinelandii* strain ATCC 9046 has been extensively studied due to its natural high-molecular-mass alginate-overproducing phenotype (13, 30). We hypothesized that this strain would accumulate higher levels of c-di-GMP, compared to our WT strain AEIV. The quantification of c-di-GMP in the ATCC 9046 strains revealed that the c-di-GMP concentration was approximately 5-fold higher in the ATCC 9046 strain than in the AEIV

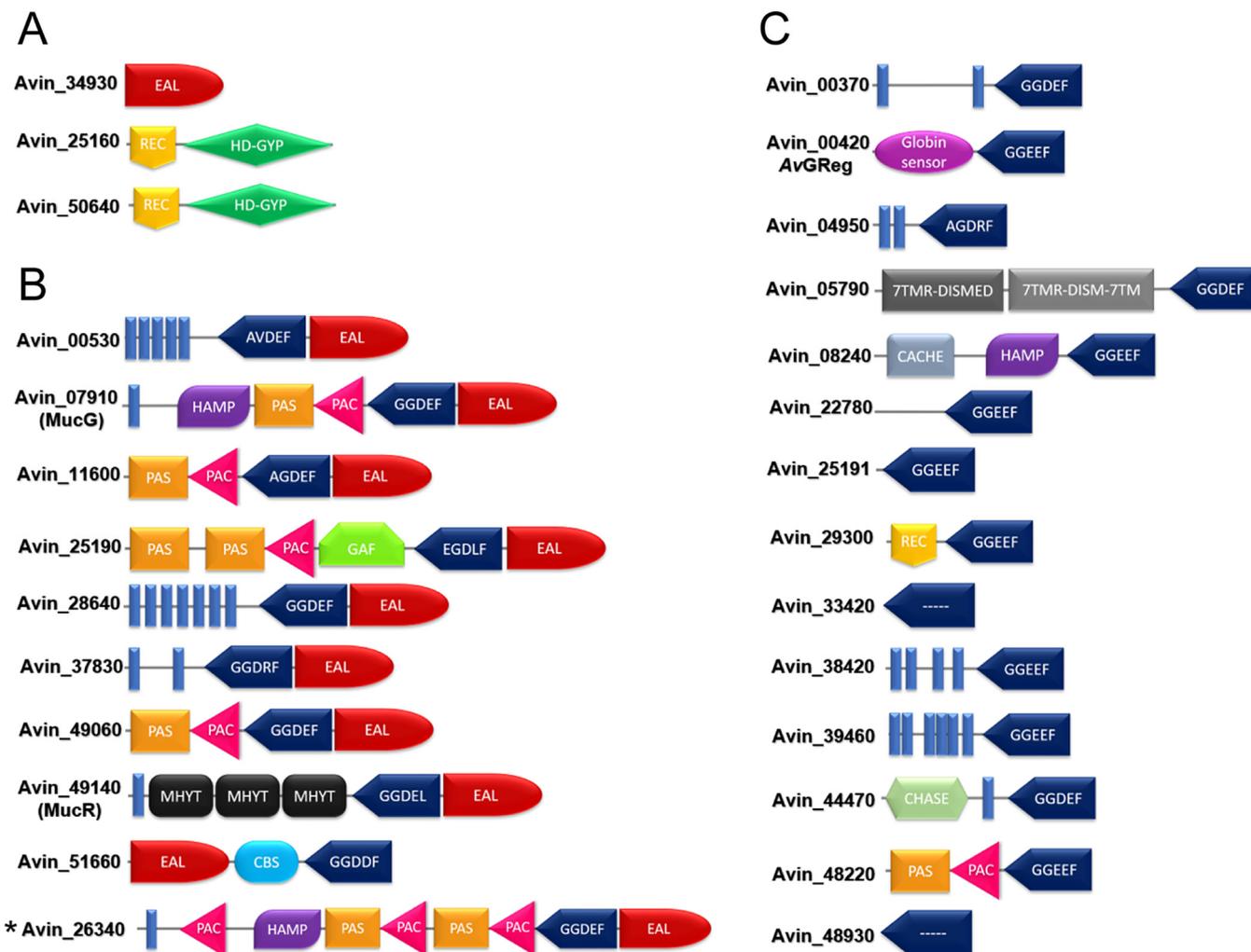


FIG 2 Depiction of the *A. vinelandii* proteins containing GGDEF, EAL, or HD-GYP domains in the genome of strain DJ. Prediction of the domains was according to Pfam and SMART. Models are not drawn to scale. Large amino acid regions without a predicted domain are also depicted. (A) EAL and HD-GYP domain-containing proteins. (B) Dual GGDEF-EAL domain-containing proteins. (C) GGDEF domain-containing proteins. The star denotes a protein encoded by the *A. vinelandii* DJ genome but not the AEIV genome. The GGDEF-EAL protein Avin_25190 was originally annotated as having an additional GGDEF domain at the C terminus. However, analysis of the DNA sequence of this open reading frame in both strain DJ and strain AEIV indicated to us that this GGDEF domain constitutes a different open reading frame, which we have named Avin_25191 (for details, see Fig. S1 in the supplemental material).

strain (Fig. 1A). Under our tested growth conditions, this strain synthesized about 2-fold more alginate than the AEIV strain, a level comparable to that of the $\Delta mucG$ and $mucG^{AAA}$ mutants (Fig. 1B). The mean molecular mass of the synthesized alginate was $2,020 \pm 250$ kDa, approximately 4 times greater than that of AEIV (Fig. 1C). The nucleotide sequence of the *mucG* gene in these two strains is conserved. Furthermore, strain ATCC 9046 showed comparable *mucG* expression levels, relative to strain AEIV, as deduced by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis conducted at both 24 and 48 h of cultivation (0.98 ± 0.06 and 1.01 ± 0.10 relative units, respectively). The *gyrA* mRNA levels were used as an internal control, allowing normalization of the qRT-PCR data. This result implies that other factors are responsible for the observed differences in c-di-GMP concentrations between these strains.

MucG is the only PDE implicated in the control of alginate production under our test conditions. The genome of *A. vinelandii* DJ strain is predicted to encode 27 proteins with putative domains for the synthesis or degradation of c-di-GMP (Fig. 2), including 3 PDEs (1 EAL type and 2 with HD-GYP domains), 10 tandem GGDEF/EAL domain proteins, and 14 GGDEF domain proteins. To investigate whether additional PDEs (besides MucG) control alginate production, we constructed insertional mutants

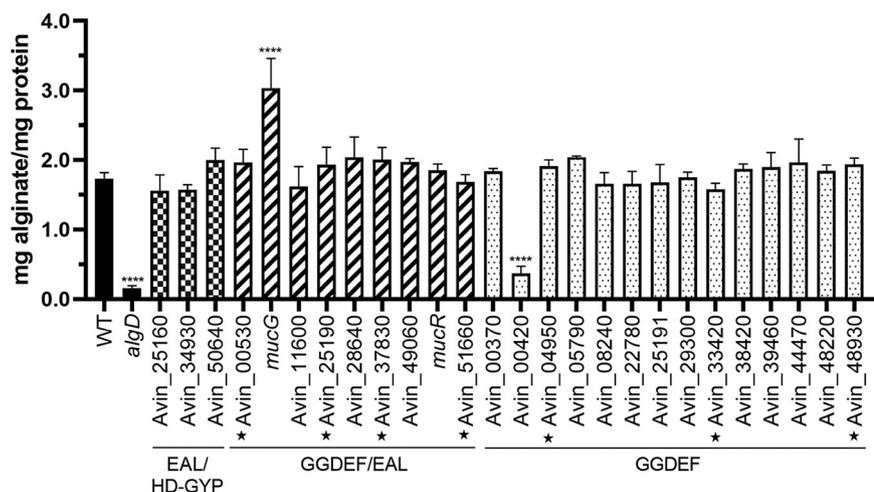


FIG 3 Effects on alginate production of mutations in genes involved in synthesizing or degrading c-di-GMP. Alginate quantification in the parental AEIV strain (WT) and in strains with deletion-insertion mutations in 3 putative PDEs (checkered), 9 hybrid DGC-PDEs (striped), and 14 DGCs (dotted). The stars denote proteins with degenerate GGDEF domains. A mutant unable to produce alginate was included as a negative control (*algD*); means and standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by one-way analysis of variance with Dunnett's *post hoc* test. Statistical significance is indicated. ****, $P < 0.0001$. Cells were grown for 48 h in liquid Burk's-sucrose medium.

in genes encoding proteins with predicted EAL or HD-GYP domains. The mutants were evaluated for their capacity to stimulate the production of alginate in liquid Burk's-sucrose medium. As can be seen in Fig. 3, except for the MucG-deficient strain, the mutants with genes encoding EAL/HD-GYP or GGDEF-EAL proteins showed alginate levels similar to those of the parental strain AEIV. This result confirmed the central role of the MucG PDE activity in the control of alginate production in *A. vinelandii* under our test conditions.

The globin-coupled sensor DGC AvGReg is the main c-di-GMP contributor for alginate production in *A. vinelandii*. The ATCC 9046 strain and the Δ *mucG* mutant accumulate higher levels of c-di-GMP and produce alginates of higher molecular mass, compared to the alginate produced by strain AEIV (25) (Fig. 1). These data suggest that c-di-GMP levels may control alginate polymerization.

A. vinelandii contains an orthologue of the DGC MucR from *P. aeruginosa* (31) that in the latter bacterium provides the c-di-GMP pool for activation of the Alg8-Alg44 polymerase complex. We evaluated the effect of MucR (Avin_49140 [GenBank accession number [ACO81013](#)], also referred to as AVIN_RS22475) on alginate biosynthesis in *A. vinelandii*. A strain carrying a deletion of *mucR* (ICM01) produced alginate levels similar to those of the parental strain AEIV, indicating that under the conditions tested MucR is not involved in alginate production (Fig. 3).

To identify potential DGCs implicated in alginate production, we constructed strains carrying individual deletions in genes coding for proteins with GGDEF domains (Fig. 2). A total of 14 mutants were generated and tested for the production of alginate in liquid Burk's-sucrose medium. As can be seen in Fig. 3, Avin_00420 was the only DGC affecting alginate production; its absence reduced by 70% the accumulation of this polysaccharide and by 60% the amount of c-di-GMP detected, relative to the parental AEIV strain (Fig. 4A). The role of Avin_00420 in alginate production was also tested in the ATCC 9046 genetic background. An ATCC 9046 derivative carrying a deletion of Avin_00420 showed a reduction of about 40% in the production of alginate, compared to the WT strain (see Fig. S2 in the supplemental material).

Avin_00420 (GenBank accession number [ACO76309](#), also called AVIN_RS00255) encodes a cytoplasmic DGC that was previously characterized and named AvGReg (32, 33). AvGReg is a 52.8-kDa protein with an N-terminal globin-coupled sensor (GCS)

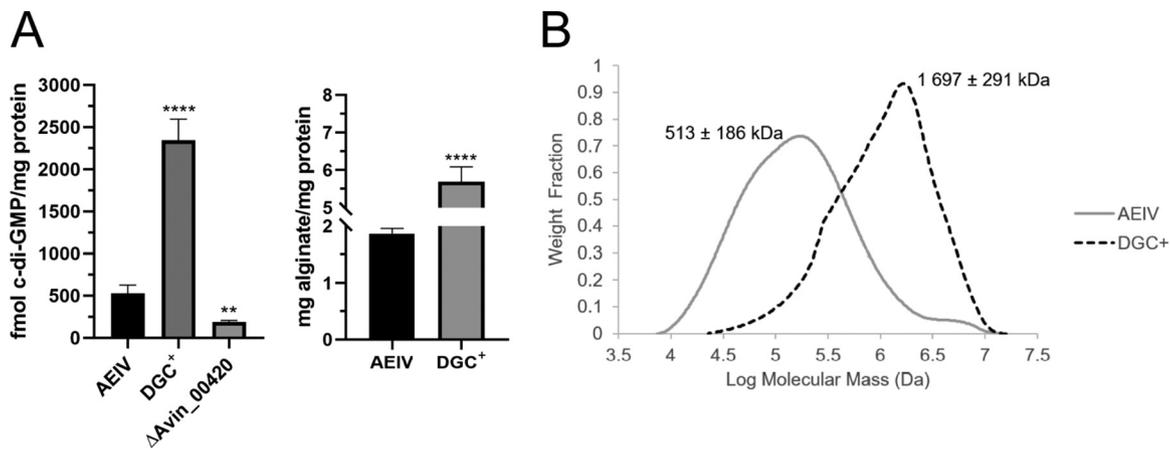


FIG 4 Effect of AvGReg (Avin_00420) overproduction on the alginate produced by *A. vinelandii*. (A) Quantification of the amount of c-di-GMP (left) and alginate (right) production in strain AEIV and in its derivative overexpressing the DGC AvGReg (DGC⁺). Production of c-di-GMP in the absence of AvGReg (Δ Avin_00420) is also shown. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$. (B) Graphic showing the molecular mass distribution of the alginates produced by strains AEIV and DGC⁺. A representative curve for each strain is shown. *A. vinelandii* strains were cultivated in Burk's-sucrose medium for 48 h.

domain and a C-terminal GGDEF transmitter domain, homologous to DosC of *Escherichia coli* (34). The DGC activity of AvGReg is stimulated by the direct binding of oxygen to its GCS domain, which displays high affinity for this diatomic molecule (33). When the GCS domain does not bind to oxygen, the DGC activity is reduced by 50% (33). The genetic arrangement of the AvGReg-encoding gene suggests that it is transcribed as a monocistron. Furthermore, orthologues of this gene were found in *Azotobacter beijerinckii* and *Azotobacter chroococcum* but not in *P. aeruginosa*.

Overproduction of AvGReg results in increased alginate production and higher alginate molecular mass. To further test whether artificial elevation of c-di-GMP could affect alginate production and polymerization, we overproduced AvGReg from a constitutive σ^{70} promoter, resulting in approximately 5-fold and 3-fold increases in c-di-GMP and alginate levels, respectively, compared to the parental AEIV strain (Fig. 4A). These results further support the role of c-di-GMP as a regulator of alginate production. Importantly, the mean molecular mass of the polymer produced by the strain overproducing AvGReg (DGC positive) was 3-fold higher than that of the WT strain (1,697 versus 513 kDa) and also exceeded the mean molecular mass of the reported MucG-deficient mutants (\sim 1,100 kDa) (Fig. 4B). Analysis of the molecular mass distribution revealed that about 60% of the alginates produced by the DGC-positive strain exhibited a molecular mass in the range of 1,000 to 10,000 kDa, confirming that increased levels c-di-GMP favor the synthesis of longer alginate chains (Fig. 4B).

We also explored whether the accumulation of c-di-GMP through overproduction of AvGReg affected other phenotypes regulated by this second messenger. As expected, higher levels of c-di-GMP arrested swimming motility on soft agar plates but enhanced biofilm formation (Fig. 5). At 24 and 48 h, the biofilm formed by the DGC-positive strain increased 3-fold, relative to the WT strain (Fig. 5B).

The OTR regulates the molecular mass of alginate by modulating the levels of c-di-GMP. In *A. vinelandii*, the molecular mass of alginate is regulated by the OTR in the culture medium. When the maximum OTR (OTR_{max}) is reduced from 5.2 to 2.5 mmol O₂/liter/h, the molecular mass of alginate produced by the WT strain AEIV increases from 596 to 969 kDa. This response is not observed in a MucG-deficient strain, since it produces alginates of high molecular mass independently of the OTR_{max} in the culture medium (Fig. 6A) (25). We hypothesized that changes in the polymer length in response to high or low OTR would be the consequence of different concentrations of c-di-GMP. We found that, in the AEIV strain, the c-di-GMP levels gradually increased when the OTR_{max} decreased from 5.2 to 1 mmol/liter/h (Fig. 6B). This increase could be the result

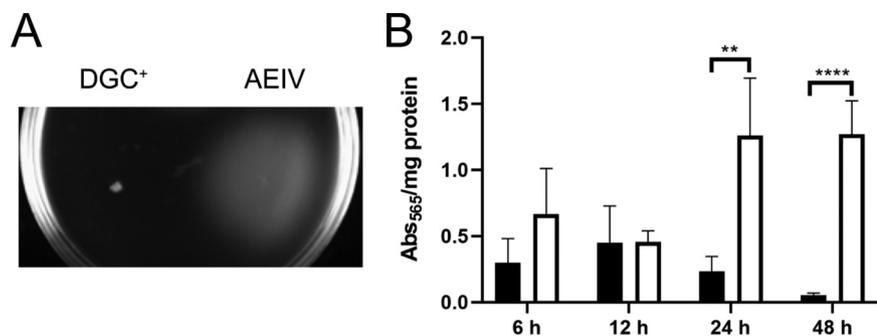


FIG 5 Effects of AvGReg overproduction on swimming motility and biofilm formation. (A) Swimming motility of strain AEIV and its derivative overexpressing AvGReg (DGC⁺) on soft agar after 24 h of incubation. (B) Quantification of biofilm formed in 24-well polystyrene plates by strains AEIV (black) and DGC⁺ (white) after static incubation at 30°C for the indicated times. Standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, *P* < 0.01; ****, *P* < 0.0001.

of reduced activity of the PDE MucG in response to different OTR conditions. To test this hypothesis, we analyzed *c*-di-GMP levels in the $\Delta mucG$ strain grown at the same OTR_{max} as described for the WT strain. The levels of *c*-di-GMP in the $\Delta mucG$ strain were always higher than those in strain AEIV. At the highest OTR_{max} (5.2 mmol/liter/h), the amount of the second messenger in the $\Delta mucG$ mutant was close to the maximum levels attained in the WT strain (at 1.0 mmol/liter/h), thus explaining the high molecular mass of the alginate produced in the absence of MucG. When OTR_{max} decreased from 5.2 to 2.5 mmol/liter/h, *c*-di-GMP levels increased in the $\Delta mucG$ strain and were unaffected by a further reduction in OTR_{max} from 2.5 to 1.0 mmol/liter/h (Fig. 6B). These results suggest that MucG is not the only modulator of *c*-di-GMP levels in response to the OTR

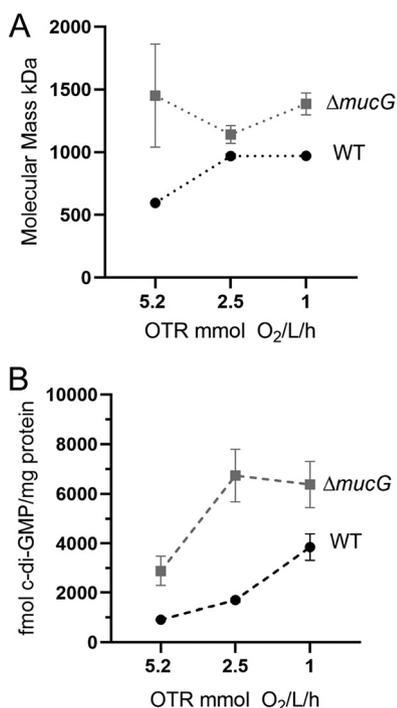


FIG 6 Levels of *c*-di-GMP vary in response to the aeration conditions of the culture medium. (A) Determination of the molecular mass of the alginates produced by the AEIV strain (WT) and the $\Delta mucG$ mutant at the indicated OTR. (B) Quantification of *c*-di-GMP in the same strains as in panel A. The cells were cultivated in Burk's-sucrose medium for 48 h. Means and standard deviations from three independent experiments are shown. Statistical analysis of *c*-di-GMP changes under the different OTR_{max} conditions evaluated is presented in Fig. S3.

and that further increases in c-di-GMP levels at lower OTR_{max} in the absence of MucG do not significantly alter the alginate molecular mass. Collectively, our data strongly suggest a key role for the PDE activity of MucG in the control of the c-di-GMP levels that determine the alginate chain length in response to OTR_{max} changes. Our results also suggest that the overall pool of c-di-GMP is smaller at the highest OTR_{max} tested, likely because of reduced DGC activity under these conditions.

DISCUSSION

The involvement of c-di-GMP signaling in the regulation of alginate biosynthesis has been documented in *P. aeruginosa* but is less well understood in *A. vinelandii*. In *P. aeruginosa*, the DGC involved in the control of alginate biosynthesis was found to be the hybrid GGDEF-EAL protein MucR (23). The *mucR* gene is regulated by the response regulator AlgR, an important regulator of alginate production in *P. aeruginosa* (35). The receptor involved in the c-di-GMP-mediated regulation of alginate production in *P. aeruginosa* was found to be Alg44, a copolymerase that binds c-di-GMP through its PilZ domain (22). Thus, MucR and Alg44 are so far the only known members of the c-di-GMP signaling module responsible for the regulation of alginate polymerization in *P. aeruginosa*. In a previous report, we showed that in *A. vinelandii* MucG exerted negative effects on alginate production and alginate molecular mass. MucG has conserved GGDEF and EAL domains; however, the negative effects exerted on alginate biosynthesis and polymerization suggested it may act as a PDE. Our results show that c-di-GMP regulates alginate biosynthesis in *A. vinelandii* and that MucG is the c-di-GMP-degrading enzyme responsible for limiting alginate production and its molecular mass. The genome of *P. aeruginosa* does not have an orthologue of *mucG*, and this observation was an early indication that the c-di-GMP signaling module that controls alginate biosynthesis in *A. vinelandii* might differ from that previously reported in *P. aeruginosa*. Furthermore, in *P. aeruginosa* an interplay between alginate polymerization and its modification was observed, in which the acetylation rate correlated with the molecular mass while the epimerization reduced the polymer chain length (9). In *A. vinelandii*, the interplay between alginate polymerization and its modification appears to have distinct characteristics. For instance, the increased production and increased molecular mass of alginates in the absence of MucG were not accompanied by changes in the acetylation rate of the polymer, compared to the WT strain (25). Another important difference in the mechanism of alginate modification in *P. aeruginosa* and *A. vinelandii* involves the activity of the periplasmic epimerase AlgG, which is crucial in *P. aeruginosa* but has negligible activity in *A. vinelandii* (12, 36). The lack of activity of AlgG in *A. vinelandii* is most likely compensated for by the contribution of a family of extracellular mannuronan C-5 epimerases (37). These important changes in the regulation of the modification events of alginates produced by *A. vinelandii* and *P. aeruginosa* might reflect differences in the biological role of this polymer in these two bacteria.

One of the main goals of this work was to determine whether one or multiple DGCs contribute to the regulation of alginate production in *A. vinelandii*. The genome of this bacterium encodes an orthologue of MucR from *P. aeruginosa*; however, this protein was dispensable for alginate biosynthesis. Instead, the *A. vinelandii* AEIV strain uses the oxygen GCS DGC AvGReg as the main c-di-GMP contributor for alginate production; AvGReg is able to bind oxygen directly, which stimulates its DGC activity (33). Its oxygen affinity is very high, one of the highest among the GCSs characterized to date and about 350-fold higher than that reported for DosC of *E. coli* (0.04 and 14 μ M, respectively) (33, 38). *A. vinelandii* is a nitrogen-fixing, strictly aerobic bacterium; therefore, in order to protect its oxygen-sensitive nitrogenase enzyme, it has evolved adaptations such as a high respiratory rate, which has been proposed to maintain low levels of cytoplasmic oxygen (39). It is unclear whether the oxygen levels that support nitrogen fixation would affect the activity of AvGReg or whether its function might be modulated by ligands that compete with oxygen under certain physiological conditions. The strain lacking AvGReg retains residual alginate production capability (Fig. 3), which is greater

than that of the strain overproducing the PDE Avin_50640. This finding suggests that other DGCs may contribute to the activation of alginate biosynthesis.

Very little is known about the signals that modulate alginate production and polymerization. We showed previously that oxygen, and more specifically the OTR, regulates alginate biosynthesis. This is of great importance, since the OTR regulates important physiological traits of *A. vinelandii* such as nitrogen fixation (40). Here, we showed that the OTR affects c-di-GMP accumulation in a manner that correlates with its regulation of alginate abundance and molecular mass in liquid medium. MucG was the main limiting factor for the production of longer alginate chains in response to changes in OTR; however, other signaling modules appear to further control c-di-GMP accumulation in response to a greater OTR in the absence of MucG (Fig. 6B). Besides the domains for c-di-GMP metabolism, MucG has a HAMP domain and a PAS domain, with the latter predicted to bind the flavin mononucleotide cofactor involved in sensing the intracellular redox state (25). It is possible that differences in the redox state derived from the distinct OTR of the culture medium are sensed by the MucG PAS domain, controlling the activity of the PDE domain. Similar cases have been documented in the past; for instance, the PDE activity of PdeO (formerly YddU) is enhanced by oxygen bound to its PAS domain (34), while the DGC activity of AxDGC2 is stimulated by the oxidized form of its flavin adenine dinucleotide cofactor (41). Also, the PDE activity of RmcA and RbdA depends on their functional PAS domains. The PDE activity is activated under oxidizing conditions in the case of RmcA (42), whereas it is suppressed by the O₂-bound PAS domain for RbdA (43), reflecting differences in their physiological roles. Based on these observations, we think it is important to determine whether MucG is a redox sensor and what the role of its sensor domain could be for the function of this enzyme. The activity of AvGReg has been shown to be dependent on oxygen availability; however, the high affinity for oxygen of its globin domain suggests that it might be constitutively active at all physiological levels of oxygen that sustain the growth of *A. vinelandii* (33). Interestingly, O₂ dissociation from AvGReg shows a biphasic behavior *in vitro*, which has been explained by the existence of two conformational states, i.e., closed and open (33). Displacement of oxygen by competitors such as CO is slower in the closed conformation than in the open complex. It is unclear how changes in the conformation of AvGReg might be regulated, but this could potentially alter signal transduction (33). It is also important to note that AvGReg could be regulated by product inhibition, given its conserved I site, which might also be an important factor that modulates its response (33). Besides its role as an oxygen sensor, the globin domain has been proposed to contribute to NO detoxification, based on some of its *in vitro* properties (32). The proposed NO-scavenging activity of AvGReg may interfere with its function as a DGC and a modulator of alginate production.

Taken together, our results indicate the existence of a c-di-GMP control module, composed of the DGC AvGReg and the PDE MucG, for the regulation of the amount and chain length of the alginate produced by *A. vinelandii* under our test conditions (planktonic growth in minimal medium) (Fig. 7). Based on the degree of conservation between Alg44 from *P. aeruginosa* and that from *A. vinelandii*, it is presumed that this protein is also the receptor involved in the regulation of alginate polymerization in *A. vinelandii*. Therefore, it would be important to investigate whether MucG colocalizes or directly interacts with Alg44 and whether its localization affects the allosteric activation of the Alg8-Alg44 polymerase complex. Considering that alginate lyases also affect the alginate chain length, we cannot rule out the possibility that any such enzymes could be regulated by the AvGReg-MucG control module. It is worth pointing out that the observed role for the AvGReg-MucG module is not restricted to the *A. vinelandii* AEIV strain, as the absence of AvGReg in ATCC 9046 also reduced the production of alginate (see Fig. S2 in the supplemental material). However, this reduction was not as marked as in strain AEIV, implying that other DGCs regulate alginate production in strain ATCC 9046, which could be related to its high polymer levels. In addition, we recently reported that the absence of MucG in the ATCC 9046 genetic background increased the molecular mass of the polymer from 2,170 to 3,112 kDa and tripled the apparent

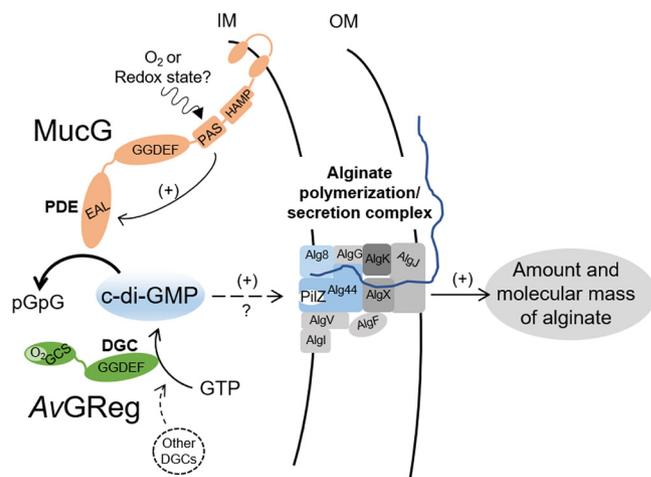


FIG 7 Proposed model for the regulation of alginate production and alginate molecular mass by the AvGReg-MucG control module in strain AEIV of *A. vinelandii*. The DGC AvGReg and the PDE MucG regulate the intracellular pool of c-di-GMP necessary for the production of alginate, likely through allosteric activation of the polymerase Alg8-Alg44 complex. Increased levels of c-di-GMP favor the synthesis of alginates with higher molecular masses. We propose that the PDE activity of MucG might be stimulated by oxidizing conditions, as detected through its PAS sensor domain, modulating the c-di-GMP pool necessary for alginate production. Other DGCs might contribute mildly, more likely in a nonspecific way, to the pool of c-di-GMP. See text for details. IM, inner membrane; OM, outer membrane.

viscosity of alginate solutions when cells were cultivated under microaerophilic conditions (44).

In an accompanying paper, we demonstrate that in *A. vinelandii* c-di-GMP also regulates the expression of a family of C-5 epimerases, AlgE1 to AlgE7, involved in the modification of alginate by introducing α -L-guluronic (G) residues into the polymer, improving its gelling properties (31). During encystment, the differentiated *A. vinelandii* cell enters a dormant stage in which it is protected by two alginate layers containing different proportions of G blocks, which are essential for surviving drought conditions (15, 37). Production of AlgE1 to AlgE7 epimerases required the DGC MucR (31). Therefore, the cyst-like structures formed by the Δ *mucR* mutant lacked the alginate coat and did not resist desiccation.

Altogether, our data revealed that c-di-GMP regulates not only the amount of the alginate produced but also its physical properties, including the viscosifying power and gelling capacity, by favoring the synthesis of longer alginate molecules with greater contents of G residues. This result has important biotechnological implications, since these two properties are the most exploited within the pharmaceutical and biomedical fields, where alginates of high purity and uniform characteristics are required (1–3). In this context and with the aim of improving the inherent properties of the alginates utilized, they are derivatized through chemical processes that tend to cause depolymerization of the alginate chain (45). The highest molecular mass reported for algal alginates is about 1,000 to 1,200 kDa (46), approximately 3 times lower than the molecular mass of alginates produced by *A. vinelandii* (about 2,000 to 3,000 kDa). Starting the derivatization process with higher-molecular-mass alginates could improve the chain length of the final polymer, expanding the biotechnological applications.

The biological significance of the synthesis of longer alginate chains in *A. vinelandii*, yielding a more viscous solution, in response to increasing amounts of c-di-GMP is likely related to biofilm structuring and environmental persistence. This would set MucG and AvGReg as key modulators of bacterial adaptation to oxygen availability in the different environments encountered by *A. vinelandii*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and cultivation conditions. The bacterial strains and plasmids used in the present work are listed in Table S1 in the supplemental material. *A. vinelandii* was routinely cultivated in minimum Burk's

nitrogen-free salts medium supplemented with 20 g liter⁻¹ of sucrose (Burk's-sucrose medium) (47). The composition of the Burk's medium and the culture conditions have been reported elsewhere (48). Cultures were routinely conducted in 250-ml Erlenmeyer flasks with a filling volume of 50 ml, at 30°C for 48 h at 200 rpm. The calculated OTR_{max} values used in this study were obtained under conditions in which we varied the volume of the culture medium using 500-ml Erlenmeyer flasks, as reported previously (25). *E. coli* DH5 α was grown in lysogeny broth (LB) at 37°C (49). When needed, the final antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli* were as follows: tetracycline, 30 and 15 μ g ml⁻¹; gentamicin, 1 and 10 μ g ml⁻¹; spectinomycin, 100 and 100 μ g ml⁻¹; ampicillin, not used and 200 μ g ml⁻¹, respectively.

Standard techniques. DNA isolation and cloning were conducted as described previously (50). The oligonucleotides used for PCR amplifications were designed based on the DJ *A. vinelandii* genome sequence (39). Sequences of the oligonucleotides used in this study are listed in Table S2. The high-fidelity Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) was used for all PCR amplifications, which were confirmed by DNA sequencing. DNA sequencing was performed with fluorescent dideoxy terminators using a cycle sequencing method and a 3130xl analyzer (Applied Biosystems).

Real-time qRT-PCR. The relative levels of *mucG* mRNA in strains AEIV and ATCC 9046 were determined by qRT-PCR following a protocol previously described (31), using total RNA extracted from cells that had been cultured for 24 and 48 h in Burk's-sucrose medium, with the primer pair qPCR-mucG-F/qPCR-mucG-R. The results were normalized relative to those obtained for the *gyrA* gene (Avin_15810).

Bioinformatic analysis. The genes for annotated proteins of *A. vinelandii* DJ strain involved in c-di-GMP metabolism were obtained from the NCBI genome (RefSeq accession number NC_012560.1). The SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) and Pfam (51) databases were used for the analysis of conserved domains. BLASTp was used for the searching of homologous proteins.

Construction of *A. vinelandii* mutants. Construction of the *A. vinelandii* mutants generated in this study is detailed in Table S1. Mutations of genes encoding enzymes for the metabolism of c-di-GMP were produced by deletion of the genes, followed by the insertion of an antibiotic resistance cassettes. Competent *A. vinelandii* cells were transformed with linearized plasmids to allow double reciprocal homologous recombination. Transformants were verified by PCR amplification and DNA sequencing of the corresponding locus carrying the desired mutation.

For the MucG D452A E453A variant (designated MucG^{GGAFF}) of the mutant CLAM06, we conducted overlapping PCR. A 224-bp fragment carrying the desired mutations (GAC→GCC and GAA→GCG) was PCR amplified using oligonucleotides GG9-RT-F and GGDEF(GGAFF)-R. The product served as a megaprimer in a second PCR to amplify the N-terminal portion of the mutated gene, using mucG-R as the reverse oligonucleotide. The assembled product was cloned in plasmid pJET1.2/Blunt vector, giving rise to pLA06.

c-di-GMP measurement. c-di-GMP quantification was conducted following a protocol described previously (52). In brief, 47 ml of culture was centrifuged at 5,752 \times g for 7 min. Cell pellets were resuspended in 1 ml of extraction solution (40% acetonitrile, 40% methanol, 0.1% formic acid, and 19.9% H₂O) and incubated for 15 min on ice. After this, samples were centrifuged at 17,949 \times g for 15 min at 4°C. The supernatant was transferred to a new Eppendorf tube, dried under vacuum, and lyophilized. The samples were resuspended in 100 μ l of ultrapformance liquid chromatography (UPLC)-grade water, and 10 μ l of this solution was injected into a liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. A c-di-GMP standard curve was determined with the following concentrations: 1.9, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, and 125 nM. The determinations were conducted by triplicate. The remaining 3 ml of culture was used to quantify protein content by the Lowry method, to normalize the production of c-di-GMP to cell protein levels (53).

Analytical methods. The specific alginate production was determined in strains grown in Burk's-sucrose medium for 48 h; 3 ml of culture was centrifuged at 5,752 \times g for 7 min, and the supernatant, containing the extracellular alginate, was transferred to a new tube. The cell pellet was resuspended, and the total protein content was determined by the Lowry method (53). The alginate collected was precipitated with 3 volumes of 2-propanol, washed twice with 70% ethanol, dried, and resuspended in 1 ml of distilled water. Alginate was quantitated by spectrophotometric determination of uronic acids with carbazole (54).

Quantification of biofilm formation by *A. vinelandii* in 24-well microtiter plates was conducted using the crystal violet protocol described previously (55, 56). Twenty-four-well polystyrene microtiter plates were loaded with 200 μ l of Burk's-sucrose medium inoculated with 10% (vol/vol) of a 25-ml culture that had been grown for 18 h in a 125-ml Erlenmeyer flask. We ran a replicate plate that served for estimating cell growth by determining the protein concentration. For all of the determinations, at least three biological replicates were conducted.

Swimming motility was assessed following a protocol reported previously (57). Two microliters of cell suspension from a 16-h culture in Burk's-sucrose medium was applied to the subsurface of 0.3% agar plates. Visualization of the motility halos was conducted after 24 h of incubation at 30°C.

Determination of the molecular mass of alginate. The alginate molecular mass was estimated by gel permeation chromatography with a serial set of Ultrahydrogel columns (UG 500 and linear; Waters), using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system with a differential refractometer detector (model 2414; Waters). The conditions and the sample preparation details are described elsewhere (25).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Bahena for computational support and M. Tabche for technical support.

This work was supported by project PAPIIT IN-204818 (Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]) to C.N. and NIH grants GM109259 and AI144395 to C.M.W. C.L.A.-M. received a Ph.D. scholarship from CONACyT to perform his Ph.D. program and from DGAPA, UNAM, for thesis completion.

REFERENCES

- Hay ID, Rehman ZU, Moradali MF, Wang Y, Rehm BHA. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb Biotechnol* 6:637–650. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>.
- Dhamecha D, Movsas R, Sano U, Menon JU. 2019. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: past, present and future. *Int J Pharm* 569:118627. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627>.
- Lee KY, Mooney DJ. 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 37:106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol* 175:7512–7518. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.11.7512>.
- Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B. 2014. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 306:L591–L603. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00335.2013>.
- Segura D, Núñez C, Espín G. 2020. *Azotobacter* cysts. In eLS. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub3>.
- Urtuvia V, Maturana N, Acevedo F, Peña C, Díaz-Barrera A. 2017. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J Microbiol Biotechnol* 33:198. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>.
- Rehman ZU, Wang Y, Moradali MF, Hay ID, Rehm BHA. 2013. Insights into the assembly of the alginate biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 79:3264–3272. <https://doi.org/10.1128/AEM.00460-13>.
- Moradali MF, Donati I, Sims IM, Ghods S, Rehm BHA. 2015. Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 6:e00453-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00453-15>.
- Bakkevig K, Sletta H, Gimmestad M, Aune R, Ertesvåg H, Degnes K, Christensen BE, Ellingsen TE, Valla S. 2005. Role of the *Pseudomonas fluorescens* alginate lyase (AlgL) in clearing the periplasm of alginates not exported to the extracellular environment. *J Bacteriol* 187:8375–8384. <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8375-8384.2005>.
- Ertesvåg H. 2015. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Front Microbiol* 6:523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>.
- Gimmestad M, Steigedal M, Ertesvåg H, Moreno S, Christensen BE, Espín G, Valla S. 2006. Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases. *J Bacteriol* 188:5551–5560. <https://doi.org/10.1128/JB.00236-06>.
- Galindo E, Peña C, Núñez C, Segura D, Espín G. 2007. Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* 6:7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>.
- Trujillo-Roldán M, Moreno S, Segura D, Galindo E, Espín G. 2003. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:733–737. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1173-7>.
- Gimmestad M, Ertesvåg H, Heggset TMB, Aarstad O, Svanem BIG, Valla S. 2009. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *J Bacteriol* 191:4845–4853. <https://doi.org/10.1128/JB.00455-09>.
- Pérez-Mendoza D, Sanjuán J. 2016. Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol* 30:36–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.12.004>.
- Whitney JC, Howell PL. 2013. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 21:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.001>.
- Römmling U, Galperin MY, Gomelsky M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:1–52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>.
- Schirmer T. 2016. c-di-GMP synthesis: structural aspects of evolution, catalysis and regulation. *J Mol Biol* 428:3683–3701. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.023>.
- Chou S-H, Galperin MY. 2016. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms. *J Bacteriol* 198:32–46. <https://doi.org/10.1128/JB.00333-15>.
- Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 65:876–895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05817.x>.
- Whitney JC, Whitfield GB, Marmont LS, Yip P, Neculai AM, Lobsanov YD, Robinson H, Ohman DE, Howell PL. 2015. Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 290:12451–12462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645051>.
- Hay ID, Remminghorst U, Rehm BHA. 2009. MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 75:1110–1120. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-08>.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. Activation mechanism and cellular localization of membrane-anchored alginate polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 83:e03499-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03499-16>.
- Ahumada-Manuel CL, Guzmán J, Peña C, Quiroz-Rocha E, Espín G, Núñez C. 2017. The signaling protein MucG negatively affects the production and the molecular mass of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:1521–1534. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7931-8>.
- Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerer A, Jenal U. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* 280:30829–30837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504429200>.
- Liu C, Liew CW, Wong YH, Tan ST, Poh WH, Manimekhalai MSS, Rajan S, Xin L, Liang Z-X, Grüber G, Rice SA, Lescar J. 2018. Insights into biofilm dispersal regulation from the crystal structure of the PAS-GGDEF-EAL region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 200:e00515-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00515-17>.
- Mantoni F, Paiardini A, Brunotti P, D'Angelo C, Cervoni L, Paone A, Cappellacci L, Petrelli R, Ricciutielli M, Leoni L, Rampioni G, Arcovito A, Rinaldo S, Cutruzzolà F, Giardina G. 2018. Insights into the GTP-dependent allosteric control of c-di-GMP hydrolysis from the crystal structure of PA0575 protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS J* 285:3815–3834. <https://doi.org/10.1111/febs.14634>.
- Bellini D, Cally DL, McCarthy Y, Bumann M, An S-Q, Dow JM, Ryan RP, Walsh MA. 2014. Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol* 91:26–38. <https://doi.org/10.1111/mmi.12447>.
- Flores C, Díaz-Barrera Á, Martínez F, Galindo E, Peña C. 2015. Role of oxygen in the polymerization and de-polymerization of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. *J Chem Technol Biotechnol* 90:356–365. <https://doi.org/10.1002/jctb.4548>.
- Martínez-Ortiz IC, Ahumada-Manuel CL, Hsueh BY, Guzmán J, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Waters CM, Zamorano-Sánchez D, Espín G, Núñez C. 2020. Cyclic di-GMP-mediated regulation of extracellular mannuronan C-5 epimerases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 202:e00135-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00135-20>.
- Thijs L, Vinck E, Bolli A, Trandafir F, Wan X, Hoogewijs D, Coletta M, Fago A, Weber RE, Doorslaer SV, Ascenzi P, Alam M, Moens L, Dewilde S. 2007.

- Characterization of a globin-coupled oxygen sensor with a gene-regulating function. *J Biol Chem* 282:37325–37340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705541200>.
33. Germani F, Nardini M, De Schutter A, Cuypers B, Berghmans H, Van Hauwaert M-L, Bruno S, Mozzarelli A, Moens L, Van Doorslaer S, Bolognesi M, Pesce A, Dewilde S. 2020. Structural and functional characterization of the globin-coupled sensors of *Azotobacter vinelandii* and *Bordetella pertussis*. *Antioxid Redox Signal* 32:378–395. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7690>.
 34. Tuckerman JR, Gonzalez G, Sousa EHS, Wan X, Saito JA, Alam M, Gilles-Gonzalez M-A. 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* 48:9764–9774. <https://doi.org/10.1021/bi901409g>.
 35. Kong W, Zhao J, Kang H, Zhu M, Zhou T, Deng X, Liang H. 2015. ChIP-seq reveals the global regulator AlgR mediating cyclic di-GMP synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* 43:8268–8282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv747>.
 36. Steigedal M, Sletta H, Moreno S, Maerk M, Christensen BE, Bjerkan T, Ellingsen TE, Espin G, Ertesvåg H, Valla S. 2008. The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. *Environ Microbiol* 10:1760–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01597.x>.
 37. Hoidal HK, Svanem BIG, Gimmestad M, Valla S. 2000. Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. *Environ Microbiol* 2:27–38. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00074.x>.
 38. Kitanishi K, Kobayashi K, Kawamura Y, Ishigami I, Ogura T, Nakajima K, Igarashi J, Tanaka A, Shimizu T. 2010. Important roles of Tyr43 at the putative heme distal side in the oxygen recognition and stability of the Fe(II)-O₂ complex of YddV, a globin-coupled heme-based oxygen sensor diguanylate cyclase. *Biochemistry* 49:10381–10393. <https://doi.org/10.1021/bi100733q>.
 39. Setubal JC, dos Santos P, Goldman BS, Ertesvåg H, Espin G, Rubio LM, Valla S, Almeida NF, Balasubramanian D, Cromes L, Curatti L, Du Z, Godsy E, Goodner B, Hellner-Burris K, Hernandez JA, Houmiel K, Imperial J, Kennedy C, Larson TJ, Latreille P, Ligon LS, Lu J, Maerk M, Miller NM, Norton S, O'Carroll IP, Paulsen I, Raulfs EC, Roemer R, Rosser J, Segura D, Slater S, Stricklin SL, Studholme DJ, Sun J, Viana CJ, Wallin E, Wang B, Wheeler C, Zhu H, Dean DR, Dixon R, Wood D. 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobic specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191:4534–4545. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>.
 40. Noar JD, Bruno-Bárcena JM. 2018. *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (Reading)* 164:421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>.
 41. Qi Y, Rao F, Luo Z, Liang Z-X. 2009. A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in Ax DGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry* 48:10275–10285. <https://doi.org/10.1021/bi901121w>.
 42. Okegbe C, Fields BL, Cole SJ, Beierschmitt C, Morgan CJ, Price-Whelan A, Stewart RC, Lee VT, Dietrich LEP. 2017. Electron-shuttling antibiotics structure bacterial communities by modulating cellular levels of c-di-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E5236–E5245. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700264114>.
 43. An S, Wu J, Zhang L-H. 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl Environ Microbiol* 76:8160–8173. <https://doi.org/10.1128/AEM.01233-10>.
 44. García A, Castillo T, Ramos D, Ahumada-Manuel CL, Núñez C, Galindo E, Büchs J, Peña C. 2020. Molecular weight and viscosifying power of alginates produced by mutant strains of *Azotobacter vinelandii* under microaerophilic conditions. *Biotechnol Rep (Amst)* 26:e00436. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00436>.
 45. Pawar SN, Edgar KJ. 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33:3279–3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.
 46. Peña C, Campos N, Galindo E. 1997. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:510–515. <https://doi.org/10.1007/s002530051088>.
 47. Kennedy C, Gamal R, Humphrey R, Ramos J, Brigle K, Dean D. 1986. The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Mol Gen Genet* 205:318–325. <https://doi.org/10.1007/BF00430445>.
 48. Núñez C, Peña C, Kloeckner W, Hernández-Eligio A, Bogachev AV, Moreno S, Guzmán J, Büchs J, Espin G. 2013. Alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* is increased by reducing the intracellular production of ubiquinone. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2503–2512. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4329-0>.
 49. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 50. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 51. Finn RD, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer ELL, Bateman A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34:D247–D251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj149>.
 52. Massie JP, Reynolds EL, Koestler BJ, Cong J-P, Agostoni M, Waters CM. 2012. Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12746–12751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115663109>.
 53. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
 54. Knutson CA, Jeanes A. 1968. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. *Anal Biochem* 24:470–481. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90154-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90154-1).
 55. O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>.
 56. Huerta JM, Aguilar I, López-Pliego L, Fuentes-Ramírez LE, Castañeda M. 2016. The role of the ncRNA RgsA in the oxidative stress response and biofilm formation in *Azotobacter vinelandii*. *Curr Microbiol* 72:671–679. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1003-2>.
 57. León R, Espín G. 2008. *flhDC*, but not *flgQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology (Reading)* 154:1719–1728. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017665-0>.