



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Función de la proteína señalizadora de c-di-GMP MucR en el proceso de enquistamiento en *Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctora en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Iliana Chantal Martínez Ortiz

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Cinthia E. Núñez López

Instituto de Biotecnología

Integrantes del Comité Tutor

Dra. Gloria Soberón Chávez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Centro de Ciencias Genómicas



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

¹Dra. Cinthia E. Núñez López

²Dra. Gloria Soberón Chávez

³Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

JURADO DE TESIS

Presidente: ¹Dr. Enrique Merino Pérez

Secretaria: ¹Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Vocal: ³Dra. María de Lourdes Girard Cuesy

Vocal: ³Dra. Isabel María López Lara

Vocal: ⁴Dr. Miguel Castañeda Lucio

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

²Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

³Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

⁴Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP)

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. Cinthía E. Núñez López.

Durante el desarrollo del presente trabajo recibí una beca para estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de becario 596217), así como por parte del PAPIIT (proyecto IN209521) durante la conclusión de este trabajo. Así mismo, la realización de este trabajo fue financiado por PAPIIT, proyectos IN204818 e IN209521 a nombre de la Dra. Cinthia E. Núñez López.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Cinthia Núñez por su excelente labor como mentora, ha sido pilar importante en mi formación y crecimiento profesional. No tengo palabras para agradecer su apoyo, enseñanza, paciencia, motivación y cariño desde que llegué al laboratorio, me siento muy afortunada de haberla encontrado y de recibir su confianza, GRACIAS por creer en mí y por impulsarme siempre, es la mejor tutora y como persona una maravilla, ¡sin dudarla la elegiría siempre!.

A los Doctores Miguel Cocotl y Richard Little por ser maestros y guías importantes en el desarrollo de mi proyecto doctoral, me siento muy afortunada de haber aprendido de su talento.

A los Doctores Guadalupe Espín y Daniel Segura por sus acertados y buenos comentarios

A los miembros del comité tutor Dra. Gloria Soberón Chávez y Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por el tiempo que dedicaron a enriquecer este trabajo, por sus sabios consejos y atinados comentarios para direccionar el proyecto.

A los miembros del jurado de tesis Enrique Merino Pérez, Dra. María de Lourdes Girard Cuesy, Dra. Isabel María López Lara y Dr. Miguel Castañeda Lucio por sus amables observaciones y comentarios para mejorar la calidad de este trabajo

A las técnicas académicas del laboratorio: Biól. Soledad Moreno por su gran apoyo técnico y enseñanzas durante el desarrollo del proyecto, pero además por estar pendiente y ofrecer su ayuda dentro y fuera del laboratorio, valoro mucho su presencia. A la M en C. Josefina Guzman por su apoyo técnico, enseñanzas y sabios consejos que trascendieron mas allá del instituto; y a la M. B. María Tabche por su ayuda y enseñanzas de las normas de seguridad en el laboratorio y por mantener la armonía y el orden en el grupo... A las tres las quiero mucho!.

A Jose Luis Gama, Doña Francis y Doña Mago por facilitarnos el trabajo, Después de la cuarentena cada día lo valoramos más.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio por su compañía, asesoría y por hacer que el tiempo se pasara volando a lado de ustedes, Leo, Victor, Marce, Elva, Cristian, Pablo, Fer, Ricardo, Gaby, Holjes, Allan... a todos los quiero mucho

A mi Aquelarre vinelandii: Jess, Citlalli, Andreita, Thalia, Marianita, Karen y Juliana, por compartir, por su apoyo incondicional, sus buenos deseos, su amistad, fraternidad y cariño, gracias por hacer un espacio seguro y libre. Por las pijamadas y por permitirme recargar pilas con ustedes siempre que es necesario

A mis Romies: César, Jess y Liz por tanta hermanad y cariño. Ha sido de las mejores experiencias compartir con ustedes, ¡los extraño!

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi mamá Griselda Ortiz y a mis hermanas Erika, Viridiana y Lorena que siempre están presentes de forma incondicional.

A mis sobrinos Key, Hilli, Camila, Sebastian y Nohelia, por llenarme de amor y hacer que todo valga la pena.

A mi casi esposo Fransisco por todo tu amor, apoyo y aliento. Gracias por ser y estar siempre, este logro es compartido.

Al resto de mi familia (primas, tías, Edsón, familia que ha compartido Paco conmigo y amigos) por celebrar conmigo cada pacito de este proyecto!

De manera muy especial a la memoria de mi abuela Cecilia Campos. Tengo tanto que decir sobre ella que nunca terminaría de escribir esta dedicatoria y algún día tengo que titularme. Por lo pronto se que siempre estará presente y que su guía es y será parte de todas las decisiones correctas... mas allá de todo nunca te olvido!

Lista de abreviaturas

aa aminoácido

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido desoxi-ribonucleico

Ars Alquil resorcinoles

ATP Adenosín trifosfato

BHB Beta-hidroxibutirato

BS Burk-sacarosa

BSA Albúmina

°C Grado centígrado

c-di-GMP Bis-(2,5)-monofosfato de guanosin cíclico

CDG Diguanilato-ciclasas

CDN Dinucleótidos Cíclicos

DO Densidad óptica

EMSA Ensayos de movilidad electroforética

Ex Exina

EPS Exopolisacárido

g Gramo

Gm gentamicina

GMP Guanosin monofosfato

GTP Guanosin trifosfato

h Horas

In Intina

kb Kilobases

kDa Kilodalton

Km Kanamicina

L Litro

LB Luria Bertani

ml Mililitro

µg Microgramo

mg Miligramo

mM Milimolar

PDE Fosfodiesterasa

pH Potencial de hidrógeno

PHB Polihidroxibutirato

PM Peso molecular

Contenido

ABSTRACT	1
RESUMEN	2
Capítulo I.....	3
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Contexto histórico del c-di-GMP	3
1.1.2. Diguanilato ciclasas (DGC's), estructura y función.....	5
1.1.3 Fosfodiesterasas (PDE's).....	7
1.1.4 Receptores	7
1.1.5 Módulos de control por c-di-GMP	8
1.2 Estrategias de adaptación al ambiente.....	9
1.2.1 Células latentes	11
1.2.2 Endosporas.....	12
1.2.3 Quistes	13
1.2.4 Células diferenciadas con fisiología complementaria	14
1.2.5 Diferenciación en células con propósito de dispersión	14
1.2.6 Desarrollo simbiótico	15
1.3 Modelos de diferenciación celular regulados por c-di-GMP	15
1.3.1 <i>C. crescentus</i>	16
1.3.2 <i>Streptomyces</i>	18
1.3.4 <i>M. xanthus</i>	21
1.4 El proceso de diferenciación celular en <i>A. vinelandii</i>	22
1.4.1 Generalidades	22
1.4.2 El ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	23
1.4.3 Cambios morfológicos durante la diferenciación celular	24
1.4.4 Cambios bioquímicos durante la diferenciación celular	24
1.4.5 El alginato, componente esencial del quiste	25
1.4.6 C-5 Epimerasas: síntesis y función.....	27
1.4.7 Sistemas de regulación durante la diferenciación celular de <i>A. vinelandii</i>	29
1.5 Antecedentes.....	31
1.5.1. Control de la producción de alginato por c-di-GMP. El papel de la DGC MucR en <i>P. aeruginosa</i>	31

1.5.2 Control de la síntesis de alginato por c-di-GMP en <i>A. vinelandii</i>	32
1.6 Hipótesis.....	34
1.7 Objetivos.....	34
1.8 Materiales y Métodos.....	35
1.8.1 Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.....	35
1.8.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	37
1.8.3 Manipulación de ADN.....	38
1.8.4 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	38
1.8.5 Construcción de mutantes de <i>A. vinelandii</i>	38
1.8.6 Construcción de la mutante mucR.....	39
1.8.7 Complementación genética de la mutante ICM01.....	39
1.8.8 Construcción de la mutante UalgR.....	40
1.8.9 Resistencia a la desecación.....	40
1.8.10 Ensayos de microscopía electrónica.....	41
1.8.11 Métodos analíticos.....	41
1.8.11.1 Extracción y cuantificación de c-di-GMP.....	41
1.8.11.2 Cuantificación de alginato.....	42
1.8.11.3 Cuantificación de proteína.....	42
1.8.11.4 Ensayo de formación de biopelícula.....	43
1.8.12 Ensayo de movilidad.....	44
1.8.13 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	44
1.8.14 Detección de C-5 epimerasas de tipo AlgE.....	45
1.8.15 Ensayo de extensión del iniciador.....	45
1.8.16 Expresión y purificación de la proteína AlgR-His.....	46
1.8.17 Ensayos de movilidad electroforética (EMSA).....	46
1.8.18 Análisis estadístico.....	47
1.9 RESULTADOS.....	48
1.9.1 SECCIÓN 1: Efecto de la proteína MucR en condiciones de crecimiento vegetativo.....	48
1.9.1.1 Efecto de la proteína MucR en las pozas de c-di-GMP durante el crecimiento vegetativo.....	48
1.9.1.2 La proteína MucR regula la formación de biopelícula y la movilidad tipo nado en <i>A. vinelandii</i>	50

1.9.2 SECCIÓN 2: Efecto de la proteína MucR en condiciones de diferenciación celular.	51
.....	
1.9.2.1 MucR es esencial para el proceso de enquistamiento.	52
1.9.2.2 MucR participa en la acumulación de c-di-GMP durante la inducción a la diferenciación celular	53
1.9.2.3 MucR no afecta los niveles de alginato durante el proceso de enquistamiento	54
1.9.2.4 Morfología de los quistes de la mutante mucR.	56
1.9.2.5 La proteína MucR regula de manera positiva las epimerasas	56
1.9.2.6 La expresión de las epimerasas AlgE1-6 se encuentra regulada por la proteína MucR	58
1.9.3 SECCIÓN 3: Estudio de la regulación transcripcional del gen <i>mucR</i>.	59
1.9.3.1 Identificación de los inicios de transcripción del gen <i>mucR</i>	60
1.9.3.2 El regulador transcripcional AlgR regula la expresión del gen <i>mucR</i>.	61
1.9.3.3 AlgR regula la transcripción del gen <i>mucR</i> por unión directa a su promotor	63
1.10 Discusión	65
1.11 Conclusiones	70
Capítulo II:	86
El estudio de la proteína RimK y su posible función como efectora de c-di-GMP durante la diferenciación celular en <i>A. vinelandii</i>	86
2 ANTECEDENTES	86
2.1 El c-di-GMP y la modificación ribosomal	86
2.2 Materiales y Métodos	88
2.2.2 Medios y condiciones de cultivo	90
2.2.3 Construcción de la mutante <i>rimK</i>	91
2.2.4 Complementación genética cruzada de mutantes <i>rimK</i>	91
2.2.5 Ensayo de ATPasa	92
2.2.6 Ensayo de Rojo Congo	93
2.2.7 Purificación de las proteínas RimK, RimB y RpsF	94
2.2.8 Ensayos de glutamilación RpsF	94
2.2.9 Ensayo de pull-down con c-di-GMP biotinilado	94
2.3 Resultados	96

2.3.1 RimK, una proteína putativa de unión a c-di-GMP, es esencial para la formación de quistes maduros.....	96
2.3.2 La proteína RimK de <i>A. vinelandii</i> tiene la capacidad de modificar el ribosoma.....	97
2.3.3 El c-di-GMP y la actividad enzimática de RimK.....	99
2.3.4 Las proteínas RimK de <i>A. vinelandii</i> y <i>P. fluorescens</i> son funcionalmente intercambiables	101
2.3.5 RimB es una proteasa que modifica el C-terminal de RpsF	102
2.4 Discusión.....	104
2.4 Conclusiones.....	105
3 REFERENCIAS.....	106

Índice de figuras

Figura 1. Componentes de señalización de c-di-GMP.....	6
Figura 2. Esquema de un módulo de control por c-di-GMP.....	9
Figura 3. Células latentes.....	12
Figura 4. Rol del c-di-GMP en <i>Caulobacter crescentus</i>	18
Figura 5. Cascada de señalización BldD- (c-di-GMP) en <i>Streptomyces</i>	20
Figura 6. Quiste maduro de <i>A. vinelandii</i>	23
Figura 7. Estructura química del alginato.....	26
Figura 8. Representación esquemática de la síntesis y modificación de alginato.....	27
Figura 9. Estructura y función de las epimerasas.....	28
Figura 10. Sistema de secreción de las MEs EexDEF.....	29
Figura 11. Los quistes de <i>A. vinelandii</i> y su estructura.....	30
Figura 12. Activación de las polimerasas de alginato Alg8/Alg44 por c-di-GMP.....	32
Figura 13. Arquitectura de la proteína MucR.....	49
Figura 14. Efecto de MucR sobre las pozas intracelulares de c-di-GMP.....	50
Figura 15. Efecto de MucR sobre el desarrollo de biopelícula y movilidad en <i>A. vinelandii</i>	51
Figura 16. MucR es necesaria para la formación de quistes maduros.....	52
Figura 17. MucR contribuye en la reserva intracelular de c-di-GMP durante la diferenciación celular.....	54
Figura 18. Efecto de MucR sobre la producción de alginato en condiciones de enquistamiento.....	55
Figura 19. Microscopia electrónica de los quistes de <i>A. vinelandii</i>	56
Figura 20. Efecto de MucR sobre las epimerasas AlgE1-7.....	57
Figura 21. Efecto de MucR sobre la transcripción de los genes de las epimerasas y de su transportador.....	59
Figura 22. Identificación del sitio de inicio de transcripción de <i>mucR</i> mediante extensión del iniciador.....	61
Figura 23. Niveles de expresión relativa del gen <i>mucR</i> mediante qRT-PCR.....	63
Figura 24. AlgR reconoce directamente la región reguladora de <i>mucR</i>	64
Figura 25. Modelo de regulación del enquistamiento en <i>A. vinelandii</i> por c-di-GMP.....	70
Figura 26. Modelo de interacción del sistema Rim en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	87

Figura 27. El sistema <i>rimA/B</i> de <i>A. vinelandii</i> y el efecto que tiene RimK sobre la producción de quistes resistentes a la desecación.....	97
Figura 28. Caracterización bioquímica de la actividad glutamil- transferasa dependiente de ATP de la proteína RimK de <i>A. vinelandii</i>	98
Figura 29. Caracterización de la actividad ATPasa de RimK de <i>A. vinelandii</i>	99
Figura 30. Unión a c-di-GMP de la proteína RimK mediante un análisis de <i>Pull-down</i>	100
Figura 31. Complementación heteróloga de <i>rimK</i> en los sistemas <i>P. fluorescens</i> y <i>A. vinelandii</i>	102
Figura 32. Caracterización enzimática de la proteína RimB de <i>A. vinelandii</i> como proteasa.....	103

Índice de tablas

Tabla 1. Número de dominios GGDEF, EAL, HD-GYP e híbridos en diferentes bacterias.....	4
Tabla 2. Ejemplo de la organización de algunos dominios de señalización en proteínas DGC o PDE.....	4
Tabla 3. Clasificación de células diferenciadas.....	11
Tabla 4. Las cepas y los plásmidos utilizados en el presente estudio.....	35
Tabla 5. Secuencia de los oligos usados en este estudio.....	36
Tabla 6. Las cepas y los plásmidos utilizados en el estudio de RimK.....	88
Tabla 7. Secuencia de los oligos utilizados en el estudio de RimK.....	90

ABSTRACT

The genus *Azotobacter*, belonging to the *Pseudomonadaceae* family, is characterized by the formation of cysts, which are metabolically dormant cells produced under adverse conditions and able to resist desiccation. Although this developmental process has served as a model for the study of cell differentiation in Gram-negative bacteria, the molecular basis of its regulation is still poorly understood. Here, we report that the ubiquitous second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) is critical for the formation of cysts in *Azotobacter vinelandii*. Upon encystment induction, the levels of c-di-GMP increased, reaching a peak within the first 6 h. In the absence of the diguanylate cyclase MucR, however, the levels of this second messenger remained low throughout the developmental process. *A. vinelandii* cysts are surrounded by two alginate layers with variable proportions of guluronic residues, which are introduced into the final alginate chain by extracellular mannuronic C-5 epimerases of the AlgE1 to AlgE7 family. Unlike in *Pseudomonas aeruginosa*, MucR was not required for alginate polymerization in *A. vinelandii*. Conversely, MucR was necessary for the expression of extracellular alginate C-5 epimerases; therefore, the MucR-deficient strain produced cyst-like structures devoid of the alginate capsule and unable to resist desiccation. Expression of *mucR* was partially dependent on the response regulator AlgR, which binds to two sites in the *mucR* promoter, enhancing *mucR* transcription. Together, these results indicate that the developmental process of *A. vinelandii* is controlled through a signaling module that involves activation by the response regulator AlgR and c-di-GMP accumulation that depends on MucR.

RESUMEN

Una de las principales características del género *Azotobacter*, perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, es la formación de quistes resistentes a la desecación. Los quistes son células metabólicamente latentes producidas en condiciones adversas. Aunque *Azotobacter vinelandii* ha servido como modelo para el estudio de la diferenciación celular en bacterias Gram negativas, las bases moleculares de su regulación son aún poco conocidas. En el presente trabajo, describimos al segundo mensajero el bis(3'→5') -diguanylate cíclico GMP (c-di-GMP), como esencial para la formación de quistes. Una vez iniciada la inducción al enquistamiento en la cepa silvestre de *A. vinelandii*, los niveles de c-di-GMP aumentan, alcanzando un pico en las primeras 6 horas. Contrario a lo anterior, en ausencia de la diguanylate ciclasa MucR, los niveles de este segundo mensajero permanecen bajos durante todo el proceso. Los quistes de *A. vinelandii* están rodeados por dos capas del exopolisacárido alginato, el cual posee proporciones variables de residuos gulurónicos; estos residuos son introducidos en la cadena final del alginato por una familia de epimerasas extracelulares, las mannuron C-5 AlgE1 a AlgE7. A diferencia de lo que ocurre en *Pseudomonas aeruginosa*, MucR no es necesaria para la polimerización del alginato en *A. vinelandii*, pero sí es necesaria para su epimerización, pues regula la expresión de las C-5 epimerasas; la cepa mutante en el gen *mucR* produjo estructuras similares a quistes, pero desprovistas de la cápsula de alginato que debe envolverlos, y por lo que, esas células fueron incapaces de resistir la desecación. La expresión de *mucR* es dependiente del regulador de respuesta AlgR, que se une a dos sitios en el promotor de *mucR*, potenciando su transcripción. En conjunto, estos resultados indican que el módulo de señalización que controla el proceso de diferenciación celular en *A. vinelandii* involucra la activación del regulador de respuesta AlgR y la acumulación de c-di-GMP dependiente de MucR.

Capítulo I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto histórico del c-di-GMP

En 1987 Benziman y colaboradores identificaron al c-di-GMP como activador de la síntesis de celulosa en *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente conocida como *Acetobacter xylinum* (Ross et al., 1987). Posteriormente descubrieron que al purificar la celulosa sintasa, esta mostraba una menor eficiencia de síntesis que al utilizar extractos celulares totales o las membranas parcialmente purificadas (Ross et al., 1987), lo que los llevo a pensar que durante el proceso de purificación perdían algún cofactor necesario para la síntesis. más tarde, la larga búsqueda culminó en la identificación de un derivado de GTP, el bis(3'→5') -diguanylate cíclico, o c-di-GMP, que actuaba como un excelente activador de la celulosa sintasa (Romling et al., 2013). Después del descubrimiento del c-di-GMP se identificaron las enzimas responsables de su síntesis y degradación como diguanylate-ciclasas (DGC's) y fosfodiesterasa (PDE's), respectivamente; el dominio GGDEF, presente en las DGC's está formado por los residuos conservados Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, y fue descrito por primera vez en 1995 por Hecht y Newton en PleD, un regulador de respuesta de un sistema de señalización de dos componentes, involucrado en la transición de células sésiles a nadadoras en *Caulobacter crescentus* (Hecht & Newton, 1995). Los dominios EAL o HD-GYP son los encargados de conferir la actividad PDE; el dominio EAL es el mas representativo, se denomina así por sus residuos conservados (Glu-Ala-Leu) fue descrito inicialmente en la proteína BvgR de *Bordetella pertusis* (Merkel et al., 1998) y es el encargado de hidrolizar el c-di-GMP a 5'pGpG, su actividad específica de PDE requiere la presencia de Mn^{+2} o Mg^{+2} y es estrictamente inhibida por Ca^{+2} , por su parte el dominio HD-GYP perteneciente a un subgrupo de la superfamilia HD con un motivo GYP extra (Dow et al., 2006) realiza la degradación completa del c-di-GMP a GMP en presencia de Mn^{2+} o Fe^{2+} (Romling et al., 2013).

La secuenciación completa de genomas bacterianos ha revelado que las proteínas con dominios GGDEF y EAL son muy abundantes, pudiéndose encontrar múltiples proteínas de este tipo en una sola bacteria (Tabla 1). De hecho, estas proteínas representan dos de las familias de proteínas señalizadoras más abundantes en bacterias (Jenal et al., 2017). Así mismo estos estudios revelaron que los dominios GGDEF y EAL se encuentran asociados a dominios señalizadores (incluyendo dominios PAS, BLUF, haemeritrina, GAF, CHASE, etc.) (Tabla 2), lo que implica que diversas señales ambientales o intracelulares están integradas a redes de regulación por el c-di-GMP.

Tabla 1. Número de dominios GGDEF, EAL, HD-GYP e híbridos en diferentes bacterias

Bacteria	GGDEF	EAL	HD-GYP	GGDEF-EAL (hybrid)
<i>Escherichia coli</i> K12	12	17	0	7
<i>Bacillus subtilis</i>	3	3	0	1
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	1	n/a	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	46	14	n/a	18
<i>Vibrio cholerae</i>	26	22	9	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	21	3	14
<i>Bacillus halodurans</i>	2	2	2	2
<i>Caulobacter crescentus</i>	11	10	0	n/a
<i>Shewanella oneidensis</i>	51	27	1	20
<i>Shigella flexneri</i>	3	6	n/a	4
<i>Salmonella Typhimurium</i>	12	14	0	n/a
<i>Vibrio fischeri</i>	28	9	n/a	10
<i>Deinococcus radiodurans</i>	16	5	4	n/a
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	8	1	n/a
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	n/a	n/a
<i>Salmonella Typhimurium</i>	12	14	n/a	n/a

n/a: número exacto no conocido Modificado de Kalia et al., 2013.

Tabla 2. Ejemplo de la organización de algunos dominios de señalización en proteínas DGC o PDE

Proteína	Organización de dominios	Organismo
PleD	REC-REC-GGDEF	<i>V. cholerae</i>
WspR	REC-GGDEF	<i>P. aeruginosa</i>
PvrR	REC-EAL	<i>C. crescentus</i>
TipF	EAL	<i>P. aeruginosa</i>
FimX	PAS-GGDEF-EAL	<i>P. aeruginosa</i>
MblA	HAMP-GGDEF-EAL	<i>C. crescentus</i>

No todas las proteínas GGDEF o EAL son activas. Por ejemplo, TipF contiene un dominio EAL, pero no tiene actividad PDE; de manera similar, FimX no es DGC ni PDE. Modificado de Kalia et al., 2013. Los dominios GGDEF y EAL se encuentran a menudo fusionados a dominios sensores como PAS (Common domain in Period/circadian protein (Per), Aryl); REC (Receiver domain); HAMP (Common domain in histidine kinases, adenylyl cyclases and methyl carrier proteins)

1.1.2. Diguanilato ciclasas (DGC's), estructura y función

Los niveles intracelulares de c-di-GMP son regulados en respuesta a señales internas y ambientales, esto se logra gracias a la actividad antagonista de dos familias de enzimas: las diguanilato ciclasas (DGC's) que poseen dominios GGDEF llevan a cabo la ciclación del c-di-GMP, mientras que las fosfodiesterasas (PDE's), que poseen dominios EAL o HD-GYP, son las encargadas de la hidrólisis (Figura 1A) (Jenal et al., 2017). La síntesis de c-di-GMP es catalizada a través de la acción cooperativa de dos dominios catalíticos GGDEF, los cuales están arreglados de manera antiparalela con una molécula de GTP unida a cada uno. Estudios mecanísticos y estructurales realizados con PleD, proponen un modelo en el que dos moléculas de GTP se posicionan de manera antiparalela para permitir su condensación a c-di-GMP (Jenal et al., 2017). La necesidad de dimerización supone un mecanismo simple para el control de las DGC, que involucra la presencia de un dominio accesorio para permitir la formación de homodímeros de una manera dependiente a una señal específica (Chan et al., 2004). Para el caso de los reguladores de respuesta PleD

o WspR de *Pseudomonas aeruginosa*, esto es facilitado por el dominio receptor amino-terminal que se dimeriza una vez que es fosforilado (Figura 1B).

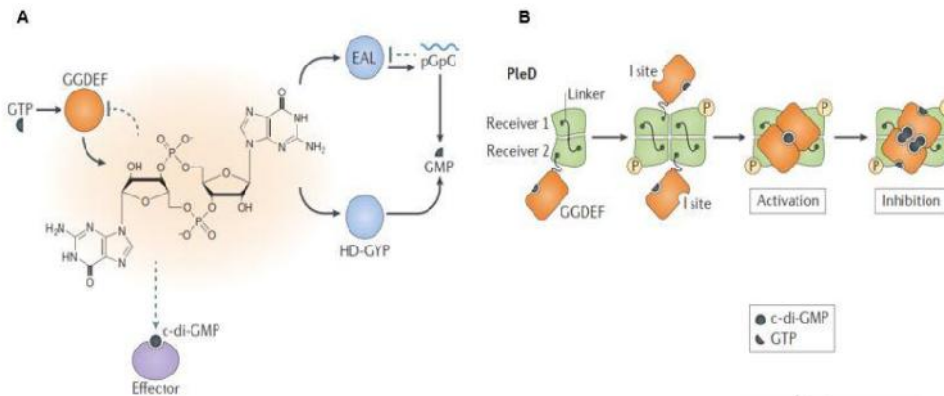


Figura 1. Componentes de señalización de c-di-GMP. A. La síntesis de c-di-GMP es catalizada por las DGC's a través de la acción cooperativa de dos dominios catalíticos GGDEF y a partir de dos moléculas de GTP. Por otro lado, las enzimas PDE que contienen dominios EAL o HD-GYP hidrolizan al c-di-GMP en pGpG o en GMP, respectivamente. **B.** Esquema de activación de la DGC PleD; se muestran los dominios receptores amino-terminal, así como el dominio GGDEF que une GTP. La fosforilación de los dominios receptores permite la activación del dominio GGDEF. La unión del c-di-GMP al sitio I y a un sitio secundario en la superficie del dominio GGDEF inmoviliza a la enzima en un estado catalíticamente inactivo Modificado de Jenal et al., 2017.

La función de cada uno de los residuos catalíticos del motivo GGDEF ya se conoce. Los primeros dos residuos de glicina están involucrados en la unión del GTP, el residuo de glutamato en la coordinación del ion metálico mientras que el aspartato y nuevamente el glutamato son indispensables para la catálisis (Chan et al., 2004). El arreglo catalítico de los dominios GGDEF también está implicado en la inhibición por producto durante la síntesis de c-di-GMP. Varias de estas enzimas están sujetas a una inhibición por producto no cooperativa a través de la unión de c-di-GMP al sitio alostérico I, en la superficie del dominio GGDEF. En PleD y WspR, un dímero intercalado de c-di-GMP se une al sitio I y a un sitio secundario de unión, inmovilizando al dominio GGDEF en un estado no catalítico (Figura 1B). La inhibición por producto de las DGC's pudiera estar involucrada en establecer de manera precisa un umbral en la concentración de c-di-GMP en la célula o a reducir las perturbaciones estocásticas y a incrementar la estabilidad de las redes de señalización por c-di-GMP, al

mantener los niveles de este segundo mensajero en una ventana de concentraciones muy bien definidas (Dahlstrom et al., 2016).

1.1.3 Fosfodiesterasas (PDE's)

Existen dos tipos de enzimas con actividad PDE encargadas de degradar el c-di-GMP, las que poseen un dominio EAL o un dominio HD-GYP que reciben esos nombres por ser los aminoácidos más conservados en el dominio, estas enzimas son estructural y mecanísticamente distintas.

Las proteínas que contienen el dominio EAL linealizan el c-di-GMP a 5'-pGpG; lo hacen de manera específica y dependiente de Mn^{++} o Mg^{++} y son inhibidas por Ca^{++} o Zn^{++} (Romling et al., 2013). Las proteínas que contienen el dominio EAL son activas como dímeros, pero en contraste con las DGC las cuales requieren un arreglo dimérico, también poseen actividad en forma monomérica. Existe una interfase de dimerización formada por dos hélices, una de ellas, la $\alpha 5$ se conecta directamente a una región central que contiene dos residuos de aspartato los cuales coordinan la unión del ion metal en el sitio activo (Romling et al., 2013). El segundo tipo de dominio PDE específico es el dominio HD-GYP de la super familia HD, cuyos miembros poseen actividad metal-dependiente fosfohidrolasa (Chou & Galperin, 2016). Estas enzimas degradan el c-di-GMP a 2 moléculas de GMP (Figura 1A).

Los dominios GGDEF y EAL a menudo pueden encontrarse como parte de una misma cadena polipeptídica (Tal et al., 1998). Existen proteínas bifuncionales, en las que ambos dominios pueden considerarse activos, pero están diferencialmente regulados por distintas señales; la posibilidad de que uno de los dos sea inactivo también existe (Schmidt et al., 2005).

1.1.4 Receptores

Mientras las proteínas relacionadas a la síntesis o hidrólisis de c-di-GMP son identificadas con facilidad debido a que poseen dominios catalíticos conservados, las proteínas receptoras o efectoras de c-di-GMP no siempre cumplen con esta característica. Existe una amplia versatilidad de ellas que las hace no compartir algunas veces similitud en estructura o secuencia.

Entre los ejemplos conocidos en la actualidad, tenemos receptores basados en secuencia como los dominios PilZ, EAL y GGDEF (sitio-I) degenerados (Kirillina et al., 2004). El dominio PilZ es uno de los primeros receptores de c-di-GMP identificados en *Gluconacetobacter xylinus* como parte del complejo celulosa-sintasa (Fujiwara et al., 2013); comprende dos motivos con el siguiente consenso RxxxRx(D/N)x(S/A)xxG involucrados en la unión de c-di-GMP; su distribución es amplia y no dependiente del número de DGC's o PDE's en el genoma (Romling et al., 2013). Los dominios GGDEF o EAL catalíticamente incompetentes pueden conservar su habilidad para retener el producto o sustrato y funcionar como proteínas receptoras (Jenal & Malone, 2006). Entre los ejemplos de receptores que comprenden dominios catalíticamente inactivos están: PopA como promotor del ciclo celular en *C. crescentus* (Ozaki et al., 2014); la histidin cinasa SgmT de *Myxococcus xanthus* (Petters et al., 2012), FimX de *P. aeruginosa* involucrada en la formación del pili tipo IV (Römling et al., 2013) y LapD de *P. fluorescens* involucrada en la producción de biopelícula (Hinsa & O'Toole, 2006).

El c-di-GMP, también es capaz de unirse a determinadas clases de riboswitches involucrados en el splicing del ARN y proteínas fuera del consenso como FleQ, una proteína de unión a ADN con actividad ATPasa perteneciente a la familia NtrC (Hickman & Harwood, 2008); otra proteína perteneciente a la misma familia es VpsR de *Vibrio cholerae* que cumple la misma función (Roelofs et al., 2015).

1.1.5 Módulos de control por c-di-GMP

Las señalizaciones dependientes de c-di-GMP forman redes pleiotrópicas capaces de establecer conexiones con otros sistemas en la célula (Grenga et al., 2017). En la actualidad, los estudios son dirigidos a establecer las funciones moleculares específicas de los motivos GGDEF, EAL y HD-GYP, sus propiedades en los procesos de señalización en los que originan diversos fenotipos de salida, como respuesta a señales ambientales, constituyendo lo que se ha denominado módulos de control. Los módulos de control están

integrados generalmente por cuatro componentes: las dos proteínas encargadas de la producción y degradación de c-di-GMP, una molécula efectora que une y es alostéricamente regulada por c-di-GMP y un componente diana, el encargado de originar el fenotipo de salida (Figura 2). La diversidad en estos componentes resulta en una red regulatoria compleja y diversa (Hengge, 2009), que puede responder de manera independiente o conjunta a una poza común de c-di-GMP, sintetizada por una misma señal y que a través de varios efectores controla un conjunto de funciones celulares.

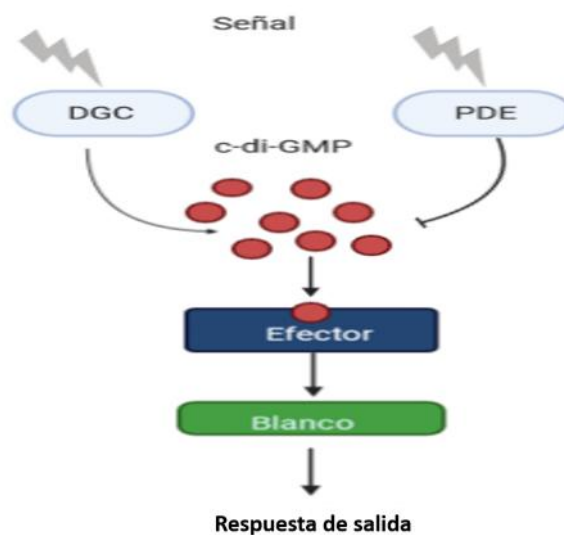


Figura 2. Esquema de un módulo de control por c-di-GMP. Se muestra el esquema de señalización general de un módulo de control en donde podemos apreciar como las pozas locales de c-di-GMP están controladas por la actividad antagónica de las proteínas DGC y PDE cuya actividad generalmente esta modulada por dominios sensores. Estas concentraciones locales de c-di-GMP son detectadas por uno o varios efectores que a través de moléculas blanco generan una respuesta de salida.

1.2 Estrategias de adaptación al ambiente

Durante la división celular los procariontes sufren una fisión binaria en la que se originan dos células hijas idénticas. Sin embargo, algunos organismos son capaces de pasar por una etapa alternativa de desarrollo que produce células hijas diferenciadas en morfología y con una finalidad distinta. Dos células se consideran diferenciadas cuando su genoma es el mismo, pero su patrón de expresión proteico es diferente. En bacterias, por ejemplo, los cambios en temperatura, disponibilidad de nutrientes o señales extracelulares juegan un

rol dinámico en la diferenciación celular. En la actualidad se han intensificado los esfuerzos que permitan entender cómo fluctuaciones del estado metabólico influyen en los programas de diferenciación celular, que las bacterias emplean como respuesta a la presión ambiental y evolutiva. Dentro de las estrategias para el control de la expresión génica durante la adaptación al ambiente se encuentra la modificación de la maquinaria de transcripción, la de traducción o una alteración de la actividad a nivel postraduccional. Estas estrategias incluyen la síntesis de factores sigmas alternativos, los cuales confieren una especificidad distinta a la ARN polimerasa, o una modificación en la actividad del ribosoma.

Existen moléculas pequeñas que poseen efectos pleiotrópicos en la fisiología, como los dinucleótidos cíclicos (CDN), que permiten una reorganización del metabolismo y una rápida adaptación al ambiente. En todos los dominios de la vida los segundos mensajeros nucleotídicos, como el cAMP, transducen señales originadas de cambios en el ambiente o de condiciones intracelulares a respuestas celulares apropiadas. Los dinucleótidos cíclicos, como el c-di-GMP o el c-di-AMP, son moléculas señalizadoras altamente versátiles que controlan varios procesos biológicos en bacterias. Aun cuando existe similitud química entre los diferentes CDN se ha propuesto que tienen origen evolutivo diferente. Esta idea junto con las enzimas que participan en la síntesis e hidrólisis de CDN da un énfasis alternativo de su versatilidad y diversidad, además por su estructura y composición de un macro anillo con dos motivos de purina son considerados acarreadores clave de información celular (Jenal et al., 2017). Un objetivo emergente es definir cómo fluctuaciones en los CDN influyen en el estado epigenético que contribuye a la diferenciación celular. Existen múltiples organismos procariontes que sufren procesos de diferenciación celular en sus ciclos de vida; estos procesos de diferenciación pueden ser clasificados dentro de cuatro categorías, según el producto de desarrollo (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de células diferenciadas

Tipo	Célula	Género representativo	Grupo
Células latentes	Endosporas	<i>Bacillus</i>	Gram positiva
		<i>Metabacterium</i>	Gram positiva
	Espora aérea	<i>Streptomyces</i>	Gram positiva
	Zoospora	<i>Dermatophilus</i>	Actinomicetos
	Quiste	<i>Azotobacter</i>	Protobacteria
		<i>Bdellovibrio</i>	Protobacteria
	Myxospora	<i>Myxococcus</i>	Protobacteria
		<i>Stigmatella</i>	Protobacteria
	Exospora	<i>Methylosinus</i>	Protobacteria
	Célula densa pequeña	<i>Coxiela</i>	Protobacteria
Cuerpo elemental	<i>Chlamydia</i>	Chlamydia	
Akineto	<i>Anabaena</i>	Cianobacteria	
Células complementarias	Heteroquiste	<i>Anabaena</i>	Cianobacteria
	Célula vegetativa		
Células de dispersión	Gonidio	<i>Leucothrix</i>	Protobacteria
	Hormogonidio	<i>Oscillatoria</i>	Cianobacteria
	Células nadadoras	<i>Caulobacter</i>	Protobacteria
	zoosporas	<i>Dermatophilus</i>	Protobacteria
Desarrollo Simbiótico	Bacteroide	<i>Rhizobium</i>	Protobacteria

Adaptada de (Sudo & Dworkin, 1973)

1.2.1 Células latentes

El esquema más común de diferenciación celular lo representan las células latentes, las cuales se forman en respuesta a algún tipo de estrés nutricional o ambiental; la diversidad de modelos procariontes que sufren este proceso de diferenciación involucra desde quistes hasta esporas (Figura 3), dependiendo de su actividad metabólica residual. Su producción involucra re-arreglos en fisiología, ultraestructura y composición bioquímica (Higgins & Dworkin, 2012; Nicholson et al., 2000; Sudo & Dworkin, 1973), pero su característica principal es que están en un estado de dormancia respecto a su contraparte vegetativa y que, además, son más tolerantes a estrés físico y químico.

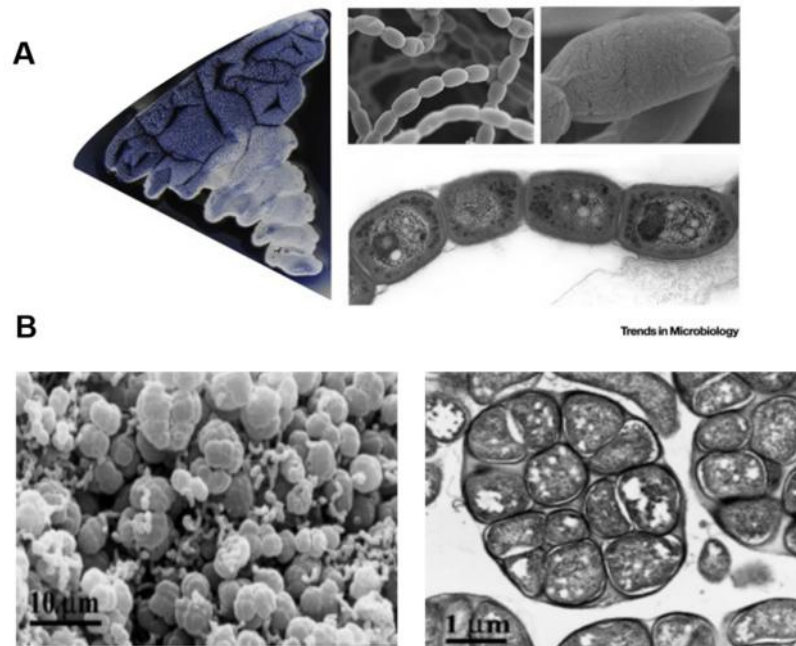


Figura 3. Células latentes. Se muestran ejemplos representativos de: **A.** Crecimiento aéreo y esporas de *Streptomyces coelicolor*, **B.** Crecimiento en cúmulos de quistes de *Rhodospirillum centenum*. Modificado de (Berleman & Bauer, 2004; Hoskisson & Wezel, 2019)

1.2.2 Endosporas

Las endosporas son las células más resistentes hasta ahora descritas, su desarrollo ha sido ampliamente estudiado en especies Gram-positiva, como *Bacillus subtilis* (Higgins & Dworkin, 2012; Piggot & Hilbert, 2004). La formación de las endosporas comienza con una división parcial de forma asimétrica y una subsecuente envoltura por parte de la célula madre, conocida como pre-espora; el genoma de la madre provee los componentes necesarios para construir el exterior de la espora, mientras que el genoma de la forespora provee los componentes para el interior de la espora. Esto es posible gracias a la presencia de factores sigma alternativos de cada compartimento, los cuales aseguran que cada genoma de lugar a un set diferente de productos (Dong & Bauer, 2015). Estas estructuras muestran una excepcional resistencia a estrés químico y físico tales como: desecación, altas temperaturas, radiación, agentes oxidantes y presión (Nicholson et al., 2000; Paidhungat et al., 2000). Otros tipos de células latentes no son formadas dentro del compartimento de la célula madre

como en las endosporas; en *Methylosinus*, por ejemplo, las esporas son producidas por una completa y asimétrica división de las células progenitoras lo que resulta en una célula madre con una espora adherida, mientras que en *Streptomyces* hay una extensiva fisión a lo largo de una célula progenitora multinucleada para formar una serie de esporas (Latoscha et al., 2019).

1.2.3 Quistes

Otro ejemplo de células latentes lo conforman los quistes, estas son células en estado de dormancia; en especies como *Anabaena*, *Myxococcus*, *Azotobacter* y otros géneros las células vegetativas son transformadas enteramente en células diferenciadas. Los quistes, no solo son distintos morfológicamente a su contraparte vegetativa, sino que también sufren cambios fisiológicos, que le permiten soportar diferencias en temperatura, contenido bajo de humedad, exposición a la luz y otras formas de estrés (Segura et al., 2020). La resistencia a la desecación es una de las principales características de los quistes, y es usado para distinguirlos de las células vegetativas; en *Azotobacter vinelandii*, por ejemplo, se han reportado quistes viables en cultivos de más de 10 años (Moreno et al., 1986). La alternancia en el desarrollo permite al organismo sobrevivir en cada fase a circunstancias particulares del ambiente.

Algunas especies capaces de formar quistes tienen importancia agronómica, hablamos de bacterias de suelo como *Azospirillum* y *Azotobacter* que producen quistes resistentes a la desecación y a temperatura (Sadasivan & Neyra, 1985; Sadoff, 1975). Estos organismos fijadores de nitrógeno son capaces de estimular el crecimiento de la planta además de proveer de nitrógeno asimilable, también estimulan la producción de hormonas como giberelinas y citoquininas.

1.2.4 Células diferenciadas con fisiología complementaria

El ejemplo más representativo de este tipo de diferenciación lo conforma *Anabaena sp.* y su heterocisto. La célula vegetativa provee de carbono orgánico derivado de la fotosíntesis al heterociste, este a su vez provee de nitrógeno a la célula vegetativa; el secuestro de la nitrogenasa en células especializadas permite mayor eficiencia en la fijación del nitrógeno, pues el O₂ generado de la fotosíntesis es un fuerte inhibidor de la nitrogenasa (Golden & Yoon, 2003). Este tipo de diferenciación no está programada dentro del ciclo celular, pero puede ser inducida por estrés ambiental como la limitación de nitrógeno (Videau & Cozy, 2019).

1.2.5 Diferenciación en células con propósito de dispersión

En este tipo de diferenciación las células pueden ser móviles respecto a su contraparte sésil o no móviles, pero liberadas bajo condiciones de fácil dispersión, ya sea por aire o agua. La diferenciación de células con fines de dispersión puede ser inducida por estrés ambiental o estar acoplada al ciclo celular (Lawler & Brun, 2007), entre ellas tenemos al gonidio de *Leucothrix*, el hormogonidium de *Oscillatoria sp* y las células nadadoras de *Caulobacter* (Brun., 2005). Uno de los ejemplos mejor documentados de células móviles diferenciadas es el de *Caulobacter*; en contraste con los principales procesos de diferenciación en bacterias, donde sus programas de desarrollo diferenciado comienzan en respuesta a señales ambientales, el desarrollo de la célula sésil de *Caulobacter* es una parte integral del crecimiento y ocurre en cada ciclo de división celular (Curtis & Brun, 2010).

1.2.6 Desarrollo simbiótico

Un grupo de α -proteobacterias, colectivamente llamado *Rhizobia*, es capaz de establecer una compleja asociación simbiótica altamente evolucionada con las raíces de las leguminosas. Esta asociación resulta en la fijación de nitrógeno atmosférico, que juega un papel importante en el ciclo global y también en la regeneración del nitrógeno presente en el suelo, necesario para la agricultura (Ferguson et al., 2019). Todas las *Rhizobia* son aerobias estrictas Gram negativas, son bacilos motiles que habitan el suelo. Sin embargo, dentro de las raíces de leguminosas sufren una transformación del estado de “vida-libre” al estado simbiótico. Un intercambio de señales químicas entre las raíces y *Rhizobia* culmina con la formación de estructuras radiculares denominadas nódulos (Margolin., 2005). Una vez que la bacteria entra en el ambiente intracelular comienza a diferenciarse a su forma endosimbiótica llamada bacteroide, que es estructural, fisiológica y morfológicamente diferente a las células de vida libre (Ferguson et al., 2019).

1.3 Modelos de diferenciación celular regulados por c-di-GMP

Todas las células transducen señales basadas en el uso de nucleótidos como segundos mensajeros, que les permiten detectar diversidad de estímulos internos y ambientales. Uno de los principales segundos mensajeros nucleotídicos es el c-di-GMP que participa en la diferenciación celular de varias bacterias (Romling et al., 2013). En general, la cascada de señalización por c-di-GMP consiste en enzimas encargadas de la síntesis y degradación de esta molécula señalizadora, además de la integración de algún estímulo y efectores, que unen c-di-GMP y causan alteraciones ya sea en la expresión de genes o en la función de la estructura celular, que culmina en la respuesta celular (Hengge, 2009).

Algunos de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la diferenciación en bacterias, basados en la señalización por c-di-GMP serán descritos a continuación con mayor detalle.

1.3.1 *C. crescentus*

Durante su desarrollo morfológico, esta bacteria pasa de ser una célula nadadora, libre y flagelada a convertirse en una célula sésil, unida firmemente al sustrato por una estructura denominada prosteca. Este proceso de diferenciación celular está estrechamente acoplado a la iniciación del ciclo celular (Curtis & Brun, 2010); la célula sésil se vuelve competente para iniciar la replicación del ADN y la posterior iniciación de una división celular asimétrica, que culmina con la formación de células nadadoras (Figura 4).

Los niveles de c-di-GMP oscilan durante el ciclo celular en *C. crescentus*, con valores bajos en las células nadadoras, un pico en la transición movil-sésil y concentraciones intermediarias durante la división. En la transición movil-sésil el incremento en las concentraciones de c-di-GMP es principalmente promovido por la DGC, PleD (Abel et al., 2011), cuya actividad es confinada a la célula sésil por la acción antagónica de dos histidin cinasas que se encuentran posicionadas de manera opuesta en los polos: PleC, que funciona como fosfatasa en células nadadoras y DivJ, que funciona como cinasa en células séviles, cuando la célula entra en fase S (Hecht & Newton, 1995). Por su parte, las PDE interactúan para mantener los niveles bajos de c-di-GMP en las células nadadoras, una de estas PDE's es PdeA localizada en el polo flagelado antes de la división y en la célula nadadora después de la partición, esta PDE mantiene los niveles de c-di-GMP bajos para promover la movilidad (Jenal et al., 2017). La degradación de la PdeA es mediada por la proteasa ClpXP en la transición movil-sésil y ocurre al reclutar ambas proteínas en el polo celular (Hecht & Newton, 1995). Otro ejemplo de la actividad de las PDE's es ilustrado por la red de señalización TipF-TipN (Dubey et al., 2020), quienes regulan la polaridad del flagelo. Después de unir c-di-GMP, TipF se localiza en el polo opuesto de la célula sésil, donde se une a su receptor polar TipN (Figura 4A). TipF entonces es requerida para el ensamble del flagelo en la célula pre-divisoria, en una mutante *tipF*, la proteína FlgE y FljK que forman parte del cuerpo basal y de la flagelina, respectivamente se ven severamente bloqueadas (Huitema et al., 2006). TipF es estable cuando une c-di-GMP, pero es

rápida­mente degradada cuando las concentraciones de c-di-GMP disminuyen en la célula nadadora (Figura 4B).

El regulador esencial de la progresión del ciclo celular CtrA es fosforilado y activado en células nadadoras (fase G1). Controla más de cien genes del ciclo celular y se une directamente al origen del cromosoma para reprimir la replicación (Romling et al., 2013). Durante la diferenciación a células sésiles CtrA es inactivada con lo que se inicia la replicación. CtrA es controlada por una cascada de fosforilación en la que participan CckA, una histidin cinasa bifuncional (con actividad de cinasa en células nadadoras y de fosfatasa en la transición G1-S) y ChpT una proteína de fosfo-transferencia. De este modo una vez que CtrA es desfosforilada, por el flujo reversible CckA-ChpT-CtrA puede ser degradada por la proteasa ClpXP (Figura 4C). Ambos eventos de desfosforilación y degradación son controlados por los niveles de c-di-GMP durante la transición de las fases G1 a S. La degradación de CtrA por ClpXP es mediada por el adaptador PopA una DGC inactiva que une c-di-GMP y es capaz de reclutar tanto CtrA como a ClpXP, mientras que la desfosforilación de CtrA resulta de la interferencia directa de c-di-GMP con CckA (Figura 4D) en su dominio catalítico de unión a ATP.

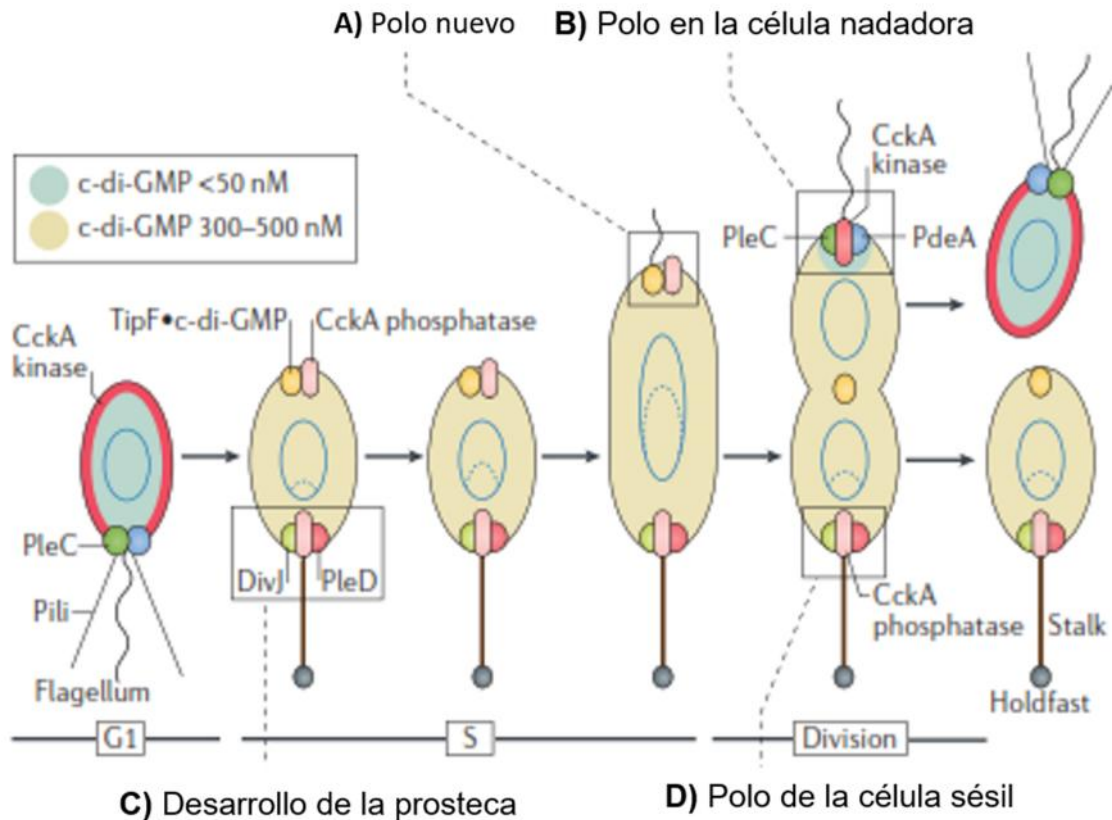


Figura 4. Rol del c-di-GMP en *Caulobacter crescentus*. Se muestra un esquema del ciclo celular de *C. crescentus*, se resaltan etapas específicas en cada polo de la célula. **A.** Después de unir c-di-GMP TipF se posiciona en el polo de la célula para reclutar los componentes flagelares y comenzar con el ensamblaje. **B.** Bajos niveles de c-di-GMP en la célula nadadora o en proceso de división, promueven la degradación de TipF por la proteasa ClpXP y la actividad cinasa de CckA por la fosfotransferencia con ChpT. **C.** Durante la diferenciación a células sésiles, CtrA es inactivada y la replicación del cromosoma es iniciada. CtrA y PdeA son degradadas por la proteasa ClpXP. PopA une c-di-GMP y entrega a CtrA a la Proteasa. PleD contribuye al incremento de los niveles de c-di-GMP en la fase S y en la célula pre-divisoria. **D.** La inactivación de CtrA por la fosfatasa CckA durante la transición móvil-sésil. La unión de c-di-GMP en el dominio catalítico de CckA causa un cambio de actividad de cinasa a fosfatasa, este flujo reverso de fosfato permite la inactivación de CtrA. Modificado de Jenal., 2017.

1.3.2 Streptomyces

Streptomyces coelicolor es una actinobacteria de suelo, filamentosa y no móvil conocida por su compleja diferenciación morfológica. El ciclo de vida de *S. coelicolor* comienza con la germinación de una espora libre que produce un largo y ramificado filamento vegetativo (Jones & Elliot, 2018). Los filamentos vegetativos crecen dentro y sobre la superficie del sustrato, pero rara vez se dividen produciendo una red de hifas multinucleadas. Estas hifas se someten a

un proceso de división celular similar a la esporulación, que resulta en un micelio compuesto de pre-esporas, las cuales poseen una copia del cromosoma. Cada pre-espora posteriormente se convierte en espora madura (Flärdh & Buttner, 2009).

Recientemente se encontró que el c-di-GMP tiene un papel clave en la transición del crecimiento del micelio vegetativo a la formación del micelio aéreo reproductivo. La delección de genes que codifican para proteínas relacionadas al metabolismo del c-di-GMP tienen notables efectos sobre la morfología de las colonias y el desarrollo del micelio (Gallagher et al., 2020; Jenal et al., 2017). En *S. coelicolor*, por ejemplo, la sobreexpresión de la DGC, CdgA bloquea la formación de hifas aéreas y resulta en la aparición de colonias “calvas” (Bush et al., 2017), mientras que, niveles bajos de c-di-GMP provocan híper-esporulación prematura. Los dominios EAL de dos PDE, RmdA y RmdB, también han sido identificados como responsables de la formación de hifas (den Hengst et al., 2010).

El regulador maestro del desarrollo en *Streptomyces* es BldD (Elliot et al., 2001), con un regulón de aproximadamente 170 genes involucrados en el proceso de esporulación. Se ha identificado que BldD es una proteína efectora de c-di-GMP (Schumacher et al., 2017), capaz de unir c-di-GMP en forma tetramérica (Figura 5), mientras que, RsiG el anti-sigma del σ -WhiG, encargado del desarrollo de las esporas durante la fase tardía de diferenciación une c-di-GMP en forma de dímero. De esta manera se demuestra que este segundo mensajero puede asumir diferentes estados oligoméricos para activar diferentes funciones (Gallagher et al., 2020; Tschowri et al., 2014); Así, bajos niveles citoplasmáticos de c-di-GMP pueden causar la disociación del dímero de BldD o RsiG- σ WhiG, su inactivación y por lo tanto la inducción de los genes de esporulación.

Los genomas de otras especies pertenecientes al género *Streptomyces* también codifican numerosas proteínas involucradas en el recambio de c-di-GMP; por ejemplo, *Streptomyces venezuelae* posee diez de estas proteínas. La

delección de cada una tiene un efecto notable en la progresión del crecimiento; cuando se sobre expresa cualquier DGC el desarrollo es bloqueado y las colonias muestran fenotipos “calvos” (Romling et al., 2013). Estos datos sugieren que la señalización de c-di-GMP regula la iniciación de la diferenciación, cuando los niveles de c-di-GMP son altos bloquean la diferenciación al arrestar las colonias en crecimiento vegetativo, mientras que niveles bajos aceleran el desarrollo a favor de la esporulación.

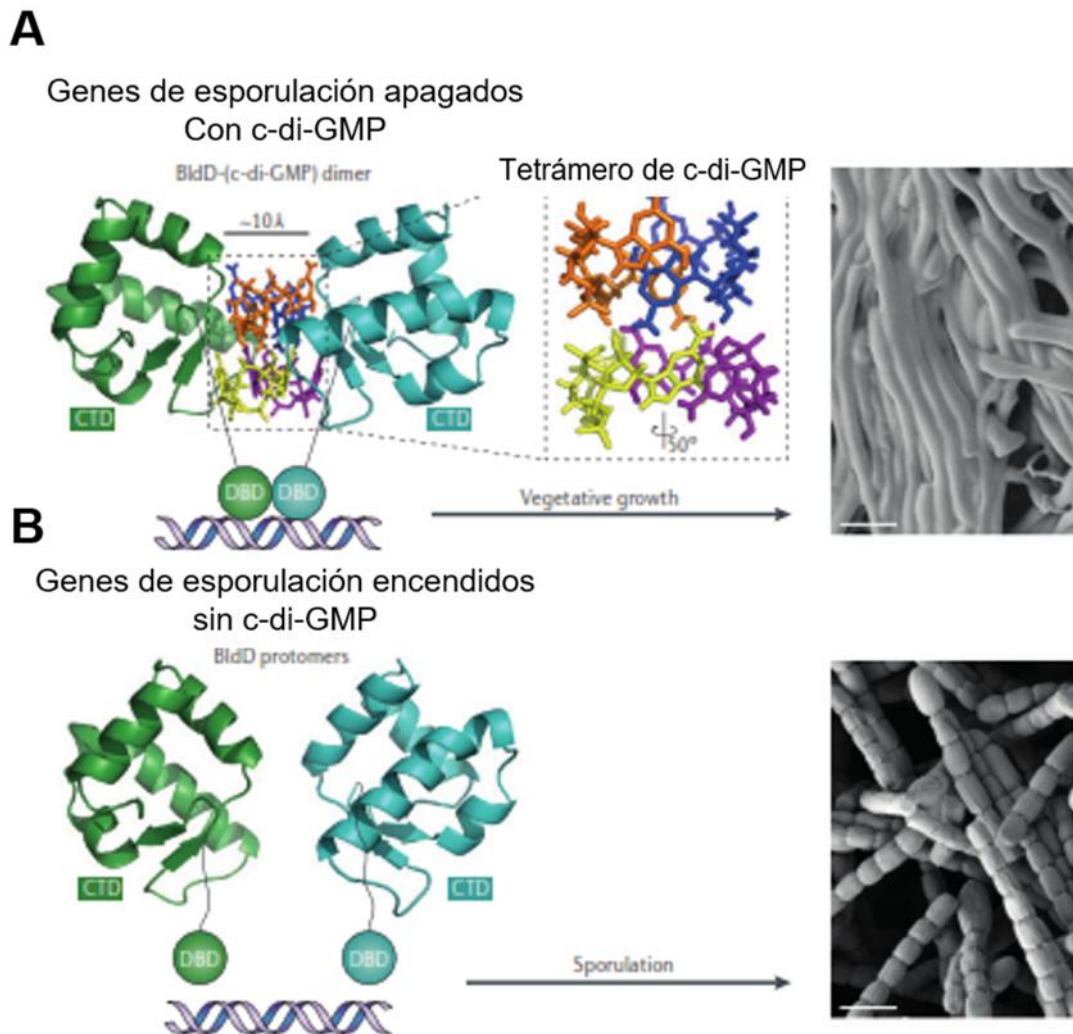


Figura 5. Cascada de señalización BldD- (c-di-GMP) en Streptomyces. **A.** Durante el crecimiento vegetativo, el c-di-GMP tetramérico actúa como un agente que controla la actividad de BldD para unirse al ADN, lo que lleva a la represión de su gran regulón de genes de esporulación. **B.** Por el contrario, cuando se libera la represión mediada por BldD, probablemente a través de una caída en los niveles de c-di-GMP, el dímero BldD se deshace, causando que se disocie del ADN y permitiendo así que toda la cascada transcripcional que conduce a la esporulación se active (Bush et al., 2015).

1.3.4 *M. xanthus*

M. xanthus, es una bacteria social que en respuesta a la privación de nutrientes inicia un programa de desarrollo multicelular, que resulta en la formación de cuerpos fructíferos, cada uno de los cuales contienen hasta >100,000 esporas (Konovalova et al., 2010). La formación de los cuerpos fructíferos comprende distintos estados morfológicos. Después de 4-6 h de limitación de nutrientes la célula, que posee una forma redonda cambia su estilo de vida móvil y comienza a formar agregados celulares (Jelsbak & Søgaard-Andersen, 2002); para las 24 h el proceso de agregación ha terminado y aquellas células que se encuentran dentro de los cuerpos fructíferos se diferencian en esporas esféricas, completándose el proceso en 72 h. La expresión del pili tipo IV (T4P), es importante para la formación del cuerpo fructífero. La movilidad T4P es dependiente del exopolisacárido (EPS) al estimular su retracción (Li et al., 2003) y la pérdida del EPS bloquea completamente la formación de cuerpos fructíferos y la esporulación (Shimkets, 1986). Se ha demostrado que *M. xanthus* acumula c-di-GMP durante su crecimiento y que éste regula la movilidad dependiente del pili tipo IV, mediante la regulación de la transcripción del gen *pilA* y la acumulación del EPS (Skotnicka, et al., 2016). En el genoma de *M. xanthus* se pueden identificar 24 genes que codifican para proteínas que contienen los dominios GGDEF, EAL O HD-GYP, tres de estos genes (*dmxA*, *sgmT* y *tmok*) son importantes para la movilidad T4P (Skotnicka & Petters, et al., 2016). El c-di-GMP se ha identificado como un regulador esencial en el desarrollo de la diferenciación celular. Niveles reducidos de c-di-GMP causan defectos en la agregación celular; la diguanilato ciclasa DmxB se ha propuesto como la única DGC funcional durante la diferenciación celular y como responsable de la formación de cuerpos fructíferos que culmina con la formación de esporas. DmxB es esencial para la transcripción de un conjunto de genes involucrados en la síntesis del EPS y además se ha descrito que el regulador transcripcional EpsI/Nlla24 es un receptor de c-di-GMP, así un aumento mínimo en el umbral de concentración de c-di-GMP es necesario para la progresión del proceso de

diferenciación celular en *M. xanthus* al unirse al regulador EpsI/Nla24 para estimular la síntesis de EPS (Skotnicka, et al., 2016).

1.4 El proceso de diferenciación celular en *A. vinelandii*

1.4.1 Generalidades

A. vinelandii es una gamma proteobacteria, Gram negativa de vida libre perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Se trata de células polimórficas, variando su morfología desde bacilos hasta células en forma de cocos; se les observa como células individuales, como pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable, se reproducen por fisión binaria, viven en suelos y en aguas frescas, además son poliploides y pueden llegar a alcanzar hasta 80 copias de su cromosoma dependiendo las condiciones de cultivo (Kennedy, et al., 2005);

Tienen un tamaño de 2 μm o más de diámetro y hasta 4 μm de longitud, son móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos y son consideradas quimiorganotróficas, es decir, que pueden utilizar ácidos orgánicos, carbohidratos, alcoholes y sales como fuente de carbono (Kennedy, et al., 2005). Son fijadores de nitrógeno; en vida libre fijan al menos 10 mg de N_2 por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido. Requieren molibdeno para fijar nitrógeno que puede ser parcialmente reemplazado por vanadio. Utilizan nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Son catalasa positivos. El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es 4.8-8.5, el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0-7.5 (Moshiri et al., 1994; Walmsley & Kennedy, 1991). Una de las características que diferencian al género *Azotobacter* de otras especies de la misma familia, como *Pseudomonas*, es que bajo condiciones adversas sufre un proceso de diferenciación celular para formar quistes resistentes a la desecación (Sadoff, 1975; Segura et al., 2020).

1.4.2 El ciclo de vida de *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* las células vegetativas son capaces de sufrir un proceso cíclico de diferenciación celular, en el que cada célula vegetativa produce una estructura resistente a daños físico-químicos, denominada quiste, y ocurre cuando las condiciones de crecimiento no son óptimas (Hitchins & Sadoff, 1970). Los quistes son estructuras redondeadas compuestas por un cuerpo central, que está rodeado de dos capas conformadas por lípidos, proteínas y una gran proporción de un exopolisacárido llamado alginato. Estas capas le confieren al quiste resistencia a la desecación. En su interior el quiste posee gránulos del poliéster poli- β -hidroxibutirato (PHB), el cual constituye una reserva de carbono y energía (Figura 6). La membrana celular del quiste está conformada por unos lípidos fenólicos, los alquil resorcinoles (AR), los cuales reemplazan a los fosfolípidos de la membrana durante el enquistamiento (Segura et al., 2020).

En la naturaleza el enquistamiento afecta a un bajo porcentaje de la población. Bajo condiciones de laboratorio en fase estacionaria tardía, por ejemplo, los quistes son formados por menos del 0.01% de las células crecidas en glucosa. Sin embargo, este proceso puede ser sincronizado por la adición de *n*-butanol o β -hidroxibutirato (BHB) como única fuente de carbono (Lin & Sadoff, 1968).

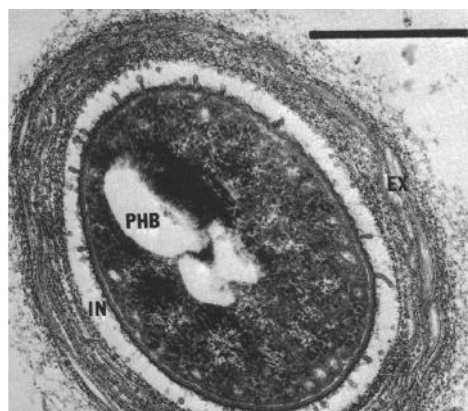


Figura 6. Quiste maduro de *A. vinelandii*. Ex, exina; In, intina; PHB, gránulos de polihidroxibutirato; (Tomado de Hitchins and Sadoff 1970).

1.4.3 Cambios morfológicos durante la diferenciación celular

La diferenciación celular en *A. vinelandii* es un proceso que se lleva a cabo en un periodo de 3 a 5 días (Hitchins & Sadoff, 1970). Estudios basados en microscopía electrónica, muestran los cambios morfológicos que ocurren durante el enquistamiento. Durante la última división celular, la célula vegetativa pierde el flagelo (Sadoff, 1975) y entra en un estado de compactación pasadas las 24-36 h de haber iniciado la diferenciación. Cuando el enquistamiento es inducido por *n*-butanol o BHB, se observan grandes inclusiones de PHB en el citoplasma (Lin & Sadoff, 1968). A las 36 h la capa más externa de la cápsula, llamada exina, comienza a formarse en la periferia del cuerpo central, para las 48 h es claramente visible en la mayoría de las células. Entre el cuerpo central y la exina, se encuentra la intina, esta se puede observar como un espacio vacío a las 36 h, sin embargo, para las 48 h se vuelve granular y aumenta de tamaño (Hitchins & Sadoff, 1970).

Entre las 72 y 120 h el quiste está en un estado de maduración, caracterizado por la reducción del cuerpo central y la aparición de múltiples capas que conforman la intina. Los quistes maduros pueden permanecer latentes por varios años en el suelo seco (Vela, 1974). Cuando las condiciones ambientales son nuevamente favorables, estas células en dormancia entran en germinación. En esta etapa que toma de 6 a 12 h, la intina se vuelve menos prominente, la exina se fragmenta y emergen dos células redondas que reinician la fase vegetativa del ciclo de vida (Segura et al., 2020).

1.4.4 Cambios bioquímicos durante la diferenciación celular

Además de los cambios morfológicos descritos, una serie de cambios bioquímicos también tienen lugar durante la diferenciación celular en *A. vinelandii*. Una vez iniciado el proceso, la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa decrece, seguido por un incremento en la actividad enzimática del metabolismo del BHB, glucogénesis y el ciclo del glioxilato. La síntesis de ADN se detiene justo después de la última división celular (entre las 4 y 6 h),

pero la síntesis de ARN continúa hasta las 12 h posteriores a la inducción (Segura et al., 2020).

Asimismo, se observan cambios significativos en la actividad respiratoria. El recambio de oxígeno disminuye 16 veces 3 h después de haber iniciado, y permanece bajo durante todo el proceso (Moshiri et al., 1994). La fijación del nitrógeno es totalmente inhibida a las 3 h, debido a la pérdida de la protección respiratoria y la proteólisis irreversible de la nitrogenasa (Kossler & Kleiner, 1986). La síntesis de proteínas continúa, hay un recambio protético de aproximadamente el 50% en las primeras 30 h, lo que indica que proteínas específicas de la diferenciación celular son sintetizadas a expensas del reciclaje de aminoácidos provenientes de proteínas no esenciales.

1.4.5 El alginato, componente esencial del quiste

El alginato es un polisacárido lineal compuesto de porciones variables de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero el ácido α -L-gulurónico (G) (Figura 7) (Urtuvia et al., 2017). La distribución de los monómeros de alginato puede estar compuesta de una cadena de bloques M, una cadena de bloques G o alternando subunidades M-G. Dos géneros bacterianos producen alginato, *Azotobacter* y *Pseudomonas*; los mecanismos de regulación y biosíntesis de alginato entre ellos son similares. La fructosa-6-fosfato es convertida a través de cuatro pasos enzimáticos a ácido-GDP-manurónico (que es el monómero precursor del alginato) en el citosol, posteriormente es transportado a la membrana interna por un andamiaje periplasmático compuesto por una glicosil-transferasa/polimerasa (Alg8) y una copolimerasa (Alg44) (Figura 8); ya en el periplasma, el ácido polimanurónico es acetilado en los sitios O₂/O₃ por un complejo de cuatro enzimas: AlgI, AlgV, AlgF y AlgX (Ertesvåg et al., 2017). Finalmente, la cadena de alginato es secretada a través de la membrana externa por la porina AlgJ. En *A. vinelandii*, ya en el ambiente extracelular, una familia de proteínas dependientes de Ca⁺⁺ con actividad epimerasa nombradas AlgE1-7, pueden modificar las subunidades M no acetiladas a subunidades G, para generar el producto final alginato (Remminghorst & Rehm, 2006).

Durante el enquistamiento, una vez que la célula se compacta, se cubre por una cápsula constituida principalmente de alginato. Este se desprende de la superficie celular, se combina y forma estructuras tipo láminas que resultan en una cápsula compacta y densa llamada exina. Con el paso del tiempo, se desarrolla un material viscoso en el área entre la pared celular y la exina, llamada intina (Wys et al., 1961). El análisis de los componentes de la cápsula indica que el alginato está constituido principalmente por bloques G-G (Larsen & Haug, 1971).

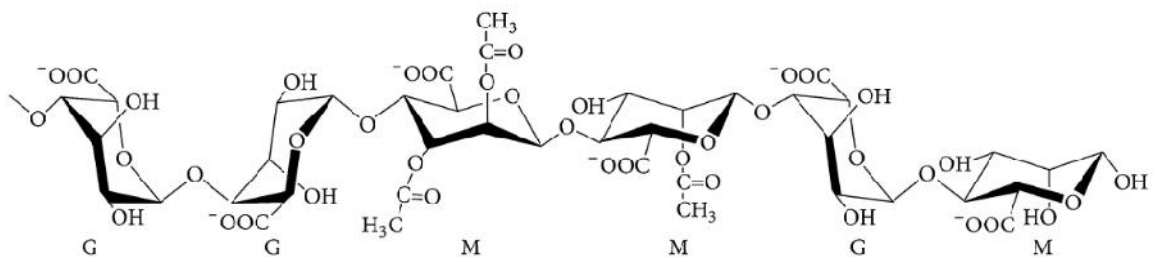


Figura 7. Estructura química del alginato. Se muestran los residuos en la molécula de ácido manurónico (M) y ácido gulurónico (G).

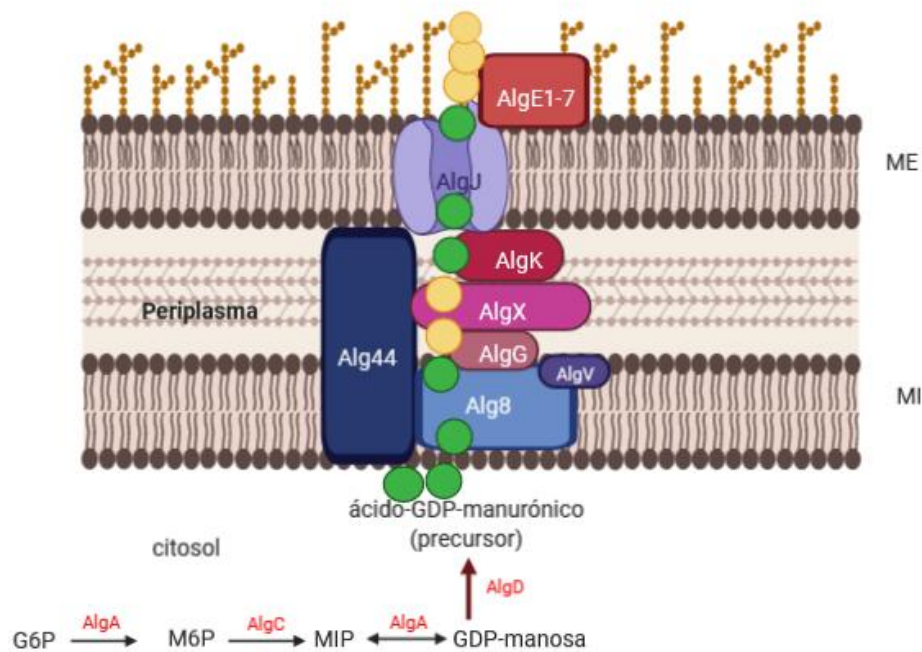


Figura 8. Representación esquemática de la síntesis y modificación de alginato. El ácido GDP-manurónico se polimeriza a nivel de membrana interna, posteriormente es transportado a través del periplasma mediante un andamiaje periplásmico para ser exportado al ambiente extracelular por la porina AlgJ. Una vez en el exterior, el alginato es modificado por las epimerasas AlgE1-7 (Adaptado de Urtuvia et al., 2017).

1.4.6 C-5 Epimerasas: síntesis y función

Como ya se mencionó, el alginato es sintetizado como ácido polimanurónico, la acción de una familia de epimerasas catalizan la conversión de algunos de estos residuos a residuos gulurónicos. Estas enzimas son las C-5 manuronato epimerasas (ME) (Ertesvåg et al., 1995). Las ME, son enzimas extra citoplasmáticas secretadas al medio por una señal N-terminal. Se trata de proteínas modulares que contienen uno o dos módulos A y de uno a siete módulos R. Dentro de cada tipo de módulo el rango de similitud varía del 50 al 100% (Figura 9). Cada enzima genera un patrón distinto de epimerización (Ertesvåg et al., 1999). Esta variación en el patrón se puede explicar por las diferencias en la estructura modular de cada una de ellas. El módulo A, tiene un tamaño de 358 aa y está presente en una o dos copias en cada enzima, contiene el sitio catalítico de la enzima y determina la distribución final de los residuos

gulturónicos producidos (Ertesvåg et al., 1999). Por su parte el otro tipo de módulo, llamado módulo R, está presente de 1 a 7 copias en las enzimas y es conocido por unir Ca^{2+} y también se ha demostrado que estimula la reacción de epimerización. El calcio induce la asociación entre cadenas, favoreciendo la gelificación; el modelo para la unión de estas cadenas es conocido como "modelo caja de huevo". En este modelo 2 pares de cadenas helicoidales son empaquetadas con iones Ca^{2+} localizados entre ellas (Figura 9) (Braccini & Pérez, 2001).

A. vinelandii posee siete genes que codifican para C-5 epimerasas (*algE1-7*), de los cuales solamente *algE5* es codificado en una región diferente al resto de los genes. Las epimerasas son exportadas por un sistema de secreción tipo I codificado por el operón *eexDEF* compuesto por los genes *eexD*, el cual codifica para un transportador tipo ABC; *eexE*, codifica para una proteína de fusión a membrana y *eexF* codifica una proteína de membrana externa (Gimmestad et al., 2006; Moreno et al., 2018). Mutantes carentes del sistema de secreción y por lo tanto de las epimerasas son incapaces de formar quistes maduros que resistan desecación (Figura 10) (Gimmestad et al., 2006; Steigedal et al., 2008).

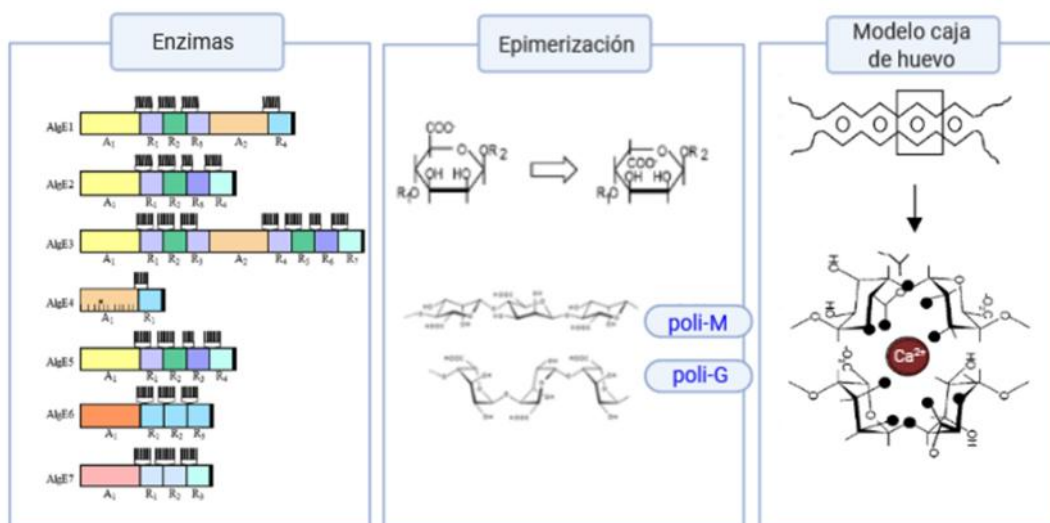


Figura 9. Estructura y función de las epimerasas. Se muestran los módulos que conforman las enzimas, el patrón de epimerización y el modelo caja de huevo responsable de la formación de geles rígidos (Aarstad et al., 2019; Braccini & Pérez, 2001; Ertesvåg, 2015).

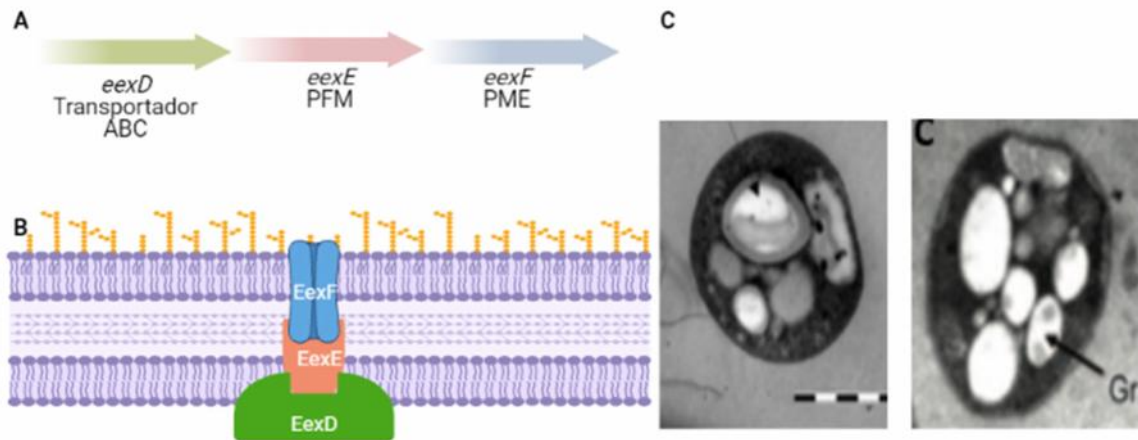


Figura 10. Sistema de secreción de las MEs EexDEF. **A.** Genes que conforman el sistema: *eexD*, codifica un transportador tipo ABC; *eexE*, codifica una proteína de fusión a membrana; *eexF*, codifica una proteína de membrana externa. **B.** Esquema del Sistema de secreción Tipo I EexDEF. **C.** Microscopía electrónica de quistes de *A. vinelandii* formados por células que carecen de las epimerasas AlgE1-7 (izquierda) y la mutante que carece del transportador *eexDEF* (derecha). (Adaptado de Steigedal et al., 2008 y Gimmestad et al., 2006).

1.4.7 Sistemas de regulación durante la diferenciación celular de *A. vinelandii*

Varios sistemas de regulación están relacionados con el desarrollo del quiste. La proteína AlgU es un factor sigma de estrés, homólogo al factor sigma RpoE de *Escherichia coli*. En *A. vinelandii* juega un papel clave en este proceso de diferenciación pues es esencial para la expresión de genes estructurales de la síntesis de alginato (Moreno et al., 1998) y también se requiere para la pérdida del flagelo (León & Espín, 2008). Por otro lado, también se ha descrito que la proteína AlgR de *A. vinelandii*, un regulador transcripcional de la familia AlgR/AgrA/LytR (Nikolskaya & Galperin, 2002), es necesario para la formación de quistes resistentes a la desecación (Núñez et al., 1999); una mutante que carece de este regulador no estructura las capas de alginato que envuelven al quiste (Figura 11). Sin embargo, se desconocen los blancos de regulación de AlgR. De manera interesante, en *P. aeruginosa* varios promotores reconocidos por el factor sigma AlgU son activados por AlgR, lo que sugiere que en *A. vinelandii* estas dos proteínas pudieran compartir blancos de regulación durante la diferenciación celular.

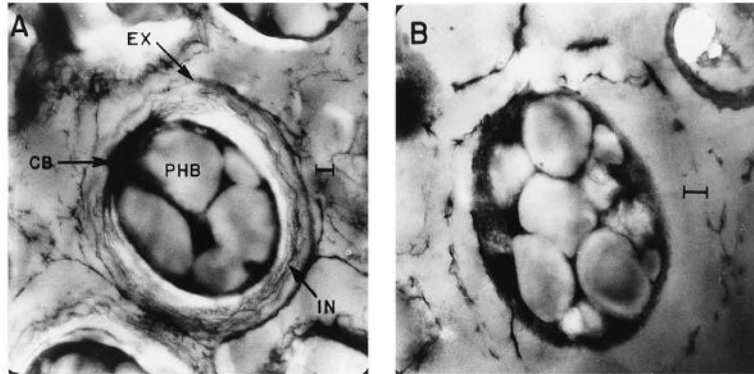


Figura 11. Los quistes de *A. vinelandii* y su estructura. A. Cepa silvestre y **B.** su derivada carente del regulador AlgR. Se aprecian las capas de alginato que conforman la exina (**EX**) e intina (**IN**), encargadas de envolver a la célula diferenciada (también llamada cuerpo basal (**CB**)); se indican además los gránulos de **PHB**. La mutante *algR*- muestra una incipiente organización de la exina. (Tomado de Núñez et al 1999).

Además de los reguladores anteriormente mencionados el sistema de dos componentes GacS-GacA tiene un papel importante durante la diferenciación celular, a través del sistema Rsm, que mediante la activación de los ARN pequeños *rsmZ* 1-7 modula la actividad de la proteína RsmA, represor de la síntesis de alginato y PHB (Hernández-Eligio et al., 2012). Asimismo, GacA también controla la expresión del factor sigma de estrés RpoS (Castañeda et al., 2001).

RpoS está implicado en la formación de quistes resistentes a la desecación mediante la regulación de la proteína de choque térmico Hsp20 encargada de la agregación eficiente de proteínas necesarias para la sobrevivencia de los quistes (Cocotl-Yáñez et al., 2011, 2014) y de la familia de epimerasas extracitoplasmáticas AlgE 1-7, necesarias en la conversión de ácido manurónico a ácido gulurónico del alginato, principal componente de la cápsula del quiste (Moreno et al., 2018).

1.5 Antecedentes

1.5.1. Control de la producción de alginato por c-di-GMP. El papel de la DGC MucR en *P. aeruginosa*

La producción de exopolisacáridos (EPS) en bacterias confiere ventajas de supervivencia, al proteger a la célula contra diferentes tipos de estrés. Los EPS son componentes principales de la matriz extracelular involucrada en el reconocimiento célula-célula, en la adhesión a superficies y en la formación de biopelículas. La síntesis de distintos tipos de EPS es activada directa o indirectamente por el c-di-GMP (Liang, 2015), uno de los ejemplos más representativo es el alginato (Hay et al., 2013). En *P. aeruginosa*, el c-di-GMP se requiere para activar alostéricamente el complejo co-polimérico Alg8/Alg44 (Figura 12). El c-di-GMP se une al dominio PilZ de Alg44 y este a su vez estimula la actividad de la polimerasa Alg8 (Hay et al., 2013). La proteína de membrana interna MucR, ha sido descrita como la encargada de sintetizar las pozas localizadas de c-di-GMP en la vecindad de Alg44.

En *P. aeruginosa*, además, MucR está involucrada en la formación de biopelículas y la movilidad (Hay et al., 2009). Esta proteína posee un dominio sensor de membrana con tres motivos MHYT, que consiste en seis segmentos transmembranales de los cuales tres tienen altamente conservados los motivos de metionina, histidina y tirosina; es capaz de detectar gases diatómicos como el NO y presenta también, dos dominios citoplasmáticos de salida, el GGDEF (de síntesis de c-di-GMP) y el EAL (de degradación de c-di-GMP). Estudios *in vitro* indican que ambos dominios son activos (Li et al., 2013). Recientemente se ha reportado que el regulador de respuesta AlgR se une a la región reguladora del gen *mucR* activando su transcripción, de esta manera AlgR controla los niveles intracelulares de c-di-GMP en esta bacteria (Kong et al., 2015).

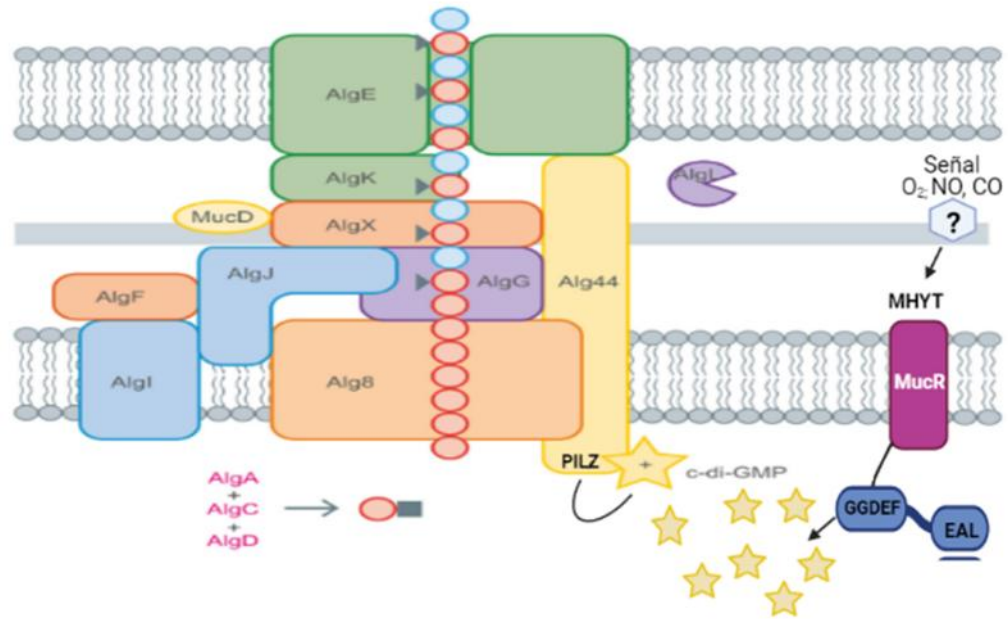


Figura 12. Activación de las polimerasas de alginato Alg8/Alg44 por c-di-GMP. En *P. aeruginosa* la DGC MucR, una proteína de membrana interna provee las pozas del segundo mensajero c-di-GMP para la activación alostérica del alginato polimerasa Alg8/Alg44. El c-di-GMP se une al dominio PilZ de Alg44. Se indican los dominios sensores MHYT de MucR, así como los gases diatómicos que se han propuesto como señal. Alg8/Alg44 forman parte de un andamiaje periplásmico encargado además del tránsito a través del periplasma de la cadena nascente de alginato y de su exportación al medio extracelular (Adaptado de Hay et al., 2009; Hay et al., 2013).

1.5.2 Control de la síntesis de alginato por c-di-GMP en *A. vinelandii*

Tanto en *P. aeruginosa* como en *A. vinelandii* la regulación postraduccional mediada por c-di-GMP se encuentra conservada. En *A. vinelandii* el ortólogo de la proteína Alg44 posee un dominio PilZ de unión a c-di-GMP (Hay et al., 2014), lo que indica que este segundo mensajero debe tener un rol clave en la síntesis del polímero en esta bacteria. Efectivamente, en un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio se reportó que niveles altos o reducidos de las pozas intracelulares de c-di-GMP aumentaban o reducían, respectivamente, la producción de alginato en *A. vinelandii*. De manera interesante, altos niveles de c-di-GMP favorecen la producción de alginatos de alto peso molecular, presumiblemente por una sobre-activación de la copolimerasa Alg44.

Aun cuando en *A. vinelandii* se encuentra un ortólogo para la proteína MucR (Whitney et al., 2015), que comparte el 75% de identidad y todos los dominios conservados (los dominios sensores MHYT y los dominios GGDEF y EAL) en un trabajo previo en el laboratorio encontramos que esta proteína no es la que provee las pozas de c-di-GMP necesarias para activar la polimerasa de alginato en *A. vinelandii*. En ausencia de MucR, *A. vinelandii* produjo niveles silvestres de este polisacárido en condiciones de crecimiento vegetativo (Martínez-Ortiz, 2016). En un trabajo reciente de nuestro laboratorio, se encontró que el módulo de control conformado por la DGC AvGReg y la PDE MucG, son los que controlan las pozas de c-di-GMP responsables de activar la polimerización del alginato durante el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii* (Ahumada-Manuel et al., 2020; Ahumada-Manuel et al., 2017).

Con la intención de establecer el papel de MucR en *A. vinelandii*, realizamos una caracterización inicial de la mutante *mucR*, revelando que en ausencia de este regulador la formación de quistes maduros se reduce 50 veces con respecto a la cepa silvestre (Martínez-Ortiz, 2016). Aunado a este hecho, y considerando que en *P. aeruginosa* el gen *mucR* es blanco directo de regulación por un activador transcripcional, AlgR, que en *A. vinelandii* es esencial para la formación de quistes, nos planteamos las siguientes preguntas básicas centrales en este trabajo: *i*) ¿Tendrá MucR algún papel durante la diferenciación celular en *A. vinelandii*?; *ii*) ¿El c-di-GMP es necesario para la diferenciación de *A. vinelandii*, más allá de controlar la polimerización de alginato?; *iii*) ¿El regulador de respuesta AlgR controla la expresión del gen *mucR*?

1.6 Hipótesis

Durante el proceso de diferenciación celular en *Azotobacter vinelandii* el segundo mensajero c-di-GMP juega un papel importante para la formación de quistes resistentes a la desecación, siendo la proteína señalizadora MucR la encargada de proveer las pozas de c-di-GMP necesarias para activar el proceso y a su vez su expresión es regulada positivamente por el regulador transcripcional AlgR.

1.7 Objetivos

General:

Establecer la función de la proteína señalizadora MucR y del segundo mensajero c-di-GMP durante el proceso de enquistamiento de *A. vinelandii*

Específicos:

- 1) Establecer la función de la proteína MucR en el proceso de diferenciación celular y su posible actividad como DGC.
- 2) Determinar la regulación de la expresión del gen *mucR*, particularmente por el regulador transcripcional AlgR.
- 3) Identificar blancos de regulación de la proteína MucR durante el proceso de enquistamiento.

1.8 Materiales y Métodos

1.8.1 Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

utilizados en este trabajo se enumeran en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Genotipo/Características Relevantes	Referencia
Cepas bacterianas		
<u><i>A. vinelandii</i></u>		
AEIV (también llamado cepa E)	Cepa silvestre	(Larsen & Haug, 1971)
ICM01	Derivada de AEIV lleva una mutación en el gen $\Delta mucR::Gm^r$.	Este trabajo
ICM09	Derivada ICM01, complementada con una copia del gen silvestre <i>mucR</i> integrado en el locus nativo del cromosoma. Gm^r , Km^r	Este trabajo
CN100	Derivada de AEIV porta la mutación $\Delta algR::Km$.	Este trabajo
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5 α	<i>supE44 $\Delta lacU169$ hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^+ m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Invitrogen
Plásmidos		
pJET1.2/Blunt vector	Vector de clonación; Ap^r	Thermo Fisher Scientific
pBSL141	Fuente del cassette de Gm^r	(Alexeyev et al., 1995)
pBSL128	Fuente del cassette de Km^r	(Alexeyev et al., 1995)
pET-21a(+)	Vector de expresión	Novagen
pBBR1MCS-2	Vector de clonación Km^r	(Kovach et al., 1995)
pJG99	Derivada del pJET1.2/Blunt vector lleva un fragmento de 2,6 kb que contiene el gen <i>mucR</i>	Este trabajo

pJG100	Derivada de pJG99 lleva una mutación en el gen $\Delta mucR::Gm$ y fue usado para la construcción de la mutante ICM01.	Este trabajo
pJG99-Km	Derivada de pJG99, lleva un cassette de Km^r como marcador de selección en el sitio <i>ScaI</i> . Fue usado para construir la cepa complementada ICM09.	Este trabajo
pJG98	Derivada del vector pJET1.2/Blunt lleva una construcción de $\Delta algR::Km$. Este plásmido, previamente linealizado con <i>ScaI</i> , fue usado para construir la mutante CN100.	Este trabajo
pETR-3P	Derivada del vector pET-21a(+). Expresa la proteína AlgR que lleva una etiqueta H6 en el N- terminal.	Este trabajo

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'–3')	Plantilla	Uso
mucR-F	CAATGCAGACCAGTCGCGCTC	ADN	Plásmido pJG99
mucR-R	CTTCGGCTGCTGTCCTGCCAG	cromosomal WT	
algR km-1	CTGTTTCAGGCCGTCGATG	ADN	Plásmido <i>palgR::Km</i>
algR km-2	CACTCACCAGACGGCTG	cromosomal WT	
algR km-3	CAGCCGTCTGGTGAGTGACCTGGG ATGAATGTCAGCTAC	pBRIMMCS- 2	
algR km-4	TGCGATGGATGCCACGAGAAGGC GGCGGTGGAATCG		
algR km-5	CGTGCGCATCCATCGCA	ADN	
algR km-6	GTCTCCAGCTCCTTGAC	cromosomal WT	
gyrAfw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	NA	qPCR control interno
gyrArev	TCGTCCAGCGGCAACAGGT		
FwRT- <i>algE1-6</i>	CACGAGCAGACCATCAACCTG	NA	qPCR <i>algE1-6</i>
RvRT- <i>algE1-6</i>	ATGTTGAAGCCGTGGCGGTCGTTG		
FwRT- <i>eexD</i>	GGTGA CTATGGGCTCTCTGG	NA	qPCR <i>eexD</i>
RvRT- <i>eexD</i>	CTCGCCCGGTATACATCTCG		
mucR-Rv- Primer	GTGTAGGAGGCGAGGATGG	NA	Extensión del iniciador <i>mucR</i>
algRBamP	CAAGGATCCAATGTTCTGATCGTC	ADN	pETR-3P
algRHindP	CACAAGCTTGGAGGCCAGTTGATT	cromosomal WT	

mucR-F-2-sitios	GAA TCC CAT CAC GCC GAC TG	ADN cromosomal WT	EMSA's sitio BS1 y sitio BS2
mucR-R-2-sitios	GAC GCT CCG TAC TGC GTA AG		
mucR-F-sitio 1	GCT TCC CCG GCA TCC CAA TA	ADN cromosomal WT	EMSA's sitio BS1
mucR-R-2-sitios	GAC GCT CCG TAC TGC GTA AG		
mucR-F-2-sitios	GAA TCC CAT CAC GCC GAC TG	ADN cromosomal WT	EMSA's sitio BS2
mucR-R-sitio 2	CTA CGC CAA AAC GCC GAG AG		

1.8.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizó la cepa silvestre AEIV de *A. vinelandii* (también llamada cepa E) (Larsen & Haug, 1971). Para el crecimiento vegetativo de *A. vinelandii* se utilizó el medio Burk-sacarosa con la siguiente composición (g/l): K₂HPO₄, 0.2; Na₂SO₄, 0.183; MgCl₂·6H₂O, 0.16; FeSO₄·7H₂O, 0.005; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0002; CaCl₂·2H₂O, 0.073, complementado con 20 g de sacarosa. Para el medio de cultivo utilizado en condiciones de enquistamiento no se adiciona sacarosa y se suplementa con 0.2% de *n*-butanol (BB). Las cepas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml aforados con 50 ml de volumen a 200 rpm y 30 °C. Para la inducción de los quistes, las células vegetativas de *A. vinelandii* (cultivadas durante 48 h en 50 ml de medio Burk-sacarosa) se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con buffer Burk (el mismo medio mineral sin fuente de carbono) para eliminar los restos de sacarosa. Las células se resuspendieron en 1 ml de buffer Burk y 200 µl de esta suspensión se colocó sobre la superficie del medio sólido Burk suplementado con 0.2% v/v de *n*-butanol (Burk-butanol), lo que induce la diferenciación celular. Las placas se incubaron durante 5 días para permitir el desarrollo de los quistes. El medio de competencia de *A. vinelandii* (CM), contiene todas las sales mencionadas anteriormente, con excepción de NaMoO₄·2H₂O y FeSO₄·7H₂

Los cultivos de *Escherichia coli* DH5α fueron crecidos en medio Luria Bertani cuya composición es la siguiente (g/l): bacto pectona, 10; extracto de

levadura, 5; cloruro de sodio 10, a 37 °C. Cuando fue necesario, las concentraciones finales de antibióticos (en µg mL⁻¹) utilizados para *A. vinelandii* y *E. coli* fueron las siguientes: gentamicina (Gm), 1 y 10; kanamicina (Km) 1 y 10; ampicilina (Ap), no utilizada y 200.

1.8.3 Manipulación de ADN

El ADN cromosomal utilizado como templado fue obtenido de la cepa silvestre AEIV y sus derivadas. La secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se enlista en la Tabla 5. Las amplificaciones de PCR se hicieron usando la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific). Se utilizaron enzimas de restricción de NE Biolabs. El aislamiento de los plásmidos y la purificación del ADN se realizaron utilizando kits de Thermo Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las construcciones fueron secuenciadas para verificar la integridad y fidelidad de la secuencia. La secuenciación del ADN se llevó a cabo por el método Sanger de Biosystems Applied.

1.8.4 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Se cultivó la cepa AEIV a 30 °C en cajas de CM durante 24 h, posteriormente se realizó un segundo pase en medio CM y se incubó a 30 °C, pero en esta ocasión el tiempo de incubación fue de 15 h, después se recogió todo el tapete celular con una espátula estéril y se lavaron las células en varias ocasiones con MgSO₄ 10 mM, con la finalidad de remover el alginato. Finalmente, esta pastilla celular libre de alginato se resuspendió en 350 µl de CM 16 mM de MgSO₄. Estas células competentes siempre se utilizaron inmediatamente después de su preparación, ya que si se almacenan pierden su competencia.

1.8.5 Construcción de mutantes de *A. vinelandii*

Los plásmidos utilizados para construir las mutantes de *A. vinelandii* se enlistan en la Tabla 4. La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo

utilizando el estado natural de competencia inducido en medio CM. Las células competentes se transformaron con el ADN plasmídico que portaba la mutación deseada previamente linealizado para asegurar la doble recombinación homóloga y el intercambio alélico. Esta mezcla de células-ADN se colocó en medio CM sólido y se extendió con la punta de la micropipeta hasta cubrir una superficie de aproximadamente 2 cm². Se incubó la caja durante 24 h a 30 °C para posteriormente recolectar el tapete celular, se lavó nuevamente con MgSO₄ y por último se plateó un volumen de entre 50 y 100 µl en medio de selección que contenía el antibiótico indicado. Esta caja se incubó en las condiciones anteriormente descritas. Debido a la naturaleza poliploide de *A. vinelandii*, la inactivación del gen en todas las copias cromosómicas fue confirmada por PCR.

1.8.6 Construcción de la mutante mucR

Un fragmento de 2.6 kb del gen *mucR* fue amplificado por PCR utilizando el par de oligos mucR-F/mucR-R, este fragmento fue ligado al plásmido pJET 1.2/ Blunt (Thermo Fisher Scientific). El vector resultante se denominó pJG99; se eliminó un fragmento interno de 1.5 kb con la enzima *BssHI*, que fue sustituido por un casete de resistencia a Gm liberado con la misma enzima del vector pBSL141 (Alexeyev et al., 1995). El plásmido generado, se denominó pJG100, y lleva el cassette de resistencia ligado en la misma orientación que el de la transcripción del gen *mucR*. Este plásmido, previamente linealizado con la endonucleasa *Scal*, fue utilizado para transformar las células de la cepa AEIV, generando la cepa ICM01 (Δ *mucR*).

1.8.7 Complementación genética de la mutante ICM01

Se introdujo una copia del gen *mucR* silvestre en el *locus* cromosomal de *mucR*. Para este fin, un fragmento *HindIII* del plásmido pBSL128, que llevaba un cassette de resistencia a Km (Alexeyev et al., 1995), fue ligado al poli-líinker del plásmido pJG99 (*mucR*+), generando el plásmido pGJ99-Km. Este plásmido, incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, se introdujo en la cepa ICM01

por transformación y se seleccionaron recombinantes simples Km^r; esto dió origen a la cepa ICM09 que fue confirmada mediante PCR.

1.8.8 Construcción de la mutante UalgR

Se construyó una cepa portadora de una delección en todo el gen *algR*, a la que se denominó CN100. La mutación $\Delta algR::Km$ fue construida por PCR recombinante. Los tres productos de PCR que se enuncian a continuación se ensamblaron mediante PCR superpuesto (Green et al., 2012):

- i) 458 pb río arriba de *algR* (del -439 a +26 con respecto al codón de inicio ATG)
- ii) 1112 pb, correspondientes al casete de Km del plásmido pBBRIMCS-2; (Alexeyev et al., 1995)
- iii) 536 pb río abajo de *algR* (del +598 a +1117 con respecto al codón de inicio ATG). El casete de resistencia a Km fue insertado en la misma orientación de la transcripción de *algR*.

La construcción de $\Delta algR::Km$ fue clonada en el vector pJET1.2 /Blunt dando lugar al plásmido pJG98. Finalmente, se linealizó con la endonucleasa *ScaI* y se transformó en células competentes de la cepa AEIV generando la mutante CN100.

1.8.9 Resistencia a la desecación

La resistencia a la desecación se evaluó siguiendo el protocolo previamente descrito (Moreno et al., 1998). En resumen, las células de *A. vinelandii* fueron cultivadas durante 48 h en 50 ml en medio Burk-sacarosa líquido, se recogieron por centrifugación y se lavaron tres veces con buffer Burk para eliminar los restos de sacarosa. Después de esto, las células fueron resuspendidas en 1 ml de buffer Burk; 200 μ l de esta suspensión se esparció en la superficie de una placa con medio Burk-butanol sólido e incubados durante 5 días a 30 °C. Después de este tiempo, las células inducidas fueron recogidas y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM. Se colocaron aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC) en membranas Millipore de 0.2 m de

tamaño y una vez secas, se incubaron durante 5 días a 30 °C, donde solo los quistes maduros son capaces de sobrevivir. Después de este tiempo, las membranas se incubaron durante 5 h en buffer Burk, las células se liberaron de las membranas por agitación vigorosa y se platearon en medio Burk-sacarosa con el antibiótico de selección. Los recuentos de células viables antes y después de la desecación se determinaron por UFC/ml en diluciones seriadas.

1.8.10 Ensayos de microscopía electrónica

La visualización de los quistes de *A. vinelandii* se hizo siguiendo el protocolo previamente reportado por (Mejía-Ruíz et al., 2006) con algunas modificaciones. Se recogieron células inducidas al enquistamiento durante 5 días en medio líquido Burk-butanol y se lavaron tres veces con buffer fosfato, pH 7,2 a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con buffer de cacodilato de sodio 0,16 M y se fijaron con una mezcla de paraformaldehído (4%)-glutaraldehído (2%) /1 h, a temperatura ambiente. Después de lavar las células de nuevo con 0,16 M de cacodilato de sodio, se fijaron con un 2% de tetraóxido de osmio durante 2 h a 4 °C. Posterior a la fijación, las células se lavaron y luego se deshidrataron pasando por una serie de etanol graduado, inmediatamente de la exposición al óxido de propileno, las muestras se incrustaron en resina Epon 812 que se dejó polimerizar durante 24 h a 65 °C. Se cortaron secciones ultrafinas, se incubaron con acetato de uranilo, se lavaron con agua destilada y se trataron con citrato de plomo, se volvieron a lavar y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión ZEISS (modelo Libra 120 a 80 kV).

1.8.11 Métodos analíticos

1.8.11.1 Extracción y cuantificación de c-di-GMP

La cuantificación de c-di-GMP se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito (Massie et al., 2012). Para la extracción, se centrifugaron 47 ml de cultivo celular inducido a enquistamiento (a 5 752 g durante 7 minutos). Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 1 ml de buffer de extracción (40% de acetonitrilo, 40% de metanol, 0,1% de ácido fórmico y 19,9% de H₂O) y se

incubaron durante 15 min en hielo. Después de esto, las muestras se centrifugaron a 17 949 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf, secado al vacío y liofilizado. Las muestras se resuspendieron en 100 µl de agua de grado UPLC y 10 µl de esta solución se inyectaron en LC-MS/MS. Se hizo una curva estándar de c-di-GMP con las siguientes concentraciones: 1.9, 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5 y 125 nM. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Los 3 ml restantes de cultivo se utilizaron para cuantificar el contenido de proteína por el método Lowry, para normalizar la producción de c-di-GMP por proteína (Lowry et al., 1951).

1.8.11.2 Cuantificación de alginato

Para determinar la producción específica de alginato, las cepas se cultivaron en condiciones de enquistamiento en placas de Burk-butanol durante 48 h. La presencia de *n*-butanol al 0,2% como única fuente de carbono desencadena la diferenciación celular en aproximadamente el 95% de la población (Sadoff, 1975; Segura et al., 2020). Después de 48 h se cosecharon las células y se lavaron dos veces con 10 ml de buffer Burk para extraer el alginato. Los pellets resultantes de la centrifugación se utilizaron para determinar el contenido total de proteína por el método Lowry (Lowry et al., 1951). El alginato de los sobrenadantes se precipitó con 3 volúmenes de 2-propanol frío, se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 1 ml de agua destilada. El alginato se cuantificó mediante la determinación espectrofotométrica de los ácidos urónicos con carbazol (Knutson & Jeanes, 1968).

1.8.11.3 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó en base al método reportado por Lowry et al., (1951). La pastilla obtenida del cultivo de *A. vinelandii* se lavó con MgSO₄ 10mM y se resuspendió en 1 ml de esta solución. Posteriormente se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 200 µl, a la cual se le añadió 1 ml de solución reactiva. Se dejó reposar 10 minutos para después agregar 100 µl de reactivo de Folín (Sigma) diluido en un volumen de agua, y

se dejó otra vez en reposo por 30 minutos. Por último, la absorbancia se lee a 625 nm. Paralelamente se corrió la curva de calibración con concentraciones de albúmina de 25, 50, 100, 200 y 400 µg/ml.

Las soluciones utilizadas fueron: A) Na₂CO₃ 2% en NaOH 0.1 N; B) Tartrato de sodio y potasio 2%; C) CuSO₄ 1%. La solución reactiva se preparó con 1 ml de solución C, más 1 ml de solución B, más 98 ml de solución A.

1.8.11.4 Ensayo de formación de biopelícula

Se inocularon por triplicado placas de 24 pozos con 1.8 ml de medio Burk-sacarosa fresco, se añadieron 200 µl de las cepas a probar provenientes de un cultivo previo de 24 h y se dejaron incubar durante 6 y 96 h (adhesión y maduración de la biopelícula según lo reportado (Liu & Li, 2008)) a 30 °C en estado estático, al cabo de este tiempo se retiraron las placas de la incubadora y se recolectaron los sobre nadantes (teniendo especial cuidado en no destruir la biopelícula), que fueron utilizados para cuantificar proteína por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Las placas se lavaron suavemente 3 veces con buffer PBS al 1X, cuya composición g/l es la siguiente NaCl, 8; KCl, 0.2; Na₂HPO₄, 1.44; KH₂PO₄, 0.245; con un pH de 7.4, posteriormente las biopelículas se fijaron con metanol al 70% durante 15 minutos; el metanol fue desechado y la biopelícula se tiñó con una solución de cristal violeta al 2% durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el exceso y se lavó cada pozo 3 veces con agua destilada, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez secas, el cristal violeta fue disuelto con ácido acético al 33% durante 15 minutos. La absorbancia fue leída a 670 nm.

1.8.12 Ensayo de movilidad

Se cultivaron las cepas AEIV y *mucR*- de *A. vinelandii* en placas de medio Burk-sacarosa a 30 °C durante 48 h; pasado este tiempo se colocaron preinóculos de las cepas durante 24 h a 30 °C en matraces de 125 ml utilizando un volumen de 25 ml, pasado este tiempo se inoculan nuevamente matraces con 25 ml de medio Burk-sacarosa pero esta vez el inóculo se estandarizó a una concentración de 400 mg/ml de proteína a 30 °C por 12 h. Una vez crecidos los cultivos se inyectaron 2 µl de cada uno en agar suave, el cual es elaborado en placas de Burk-sacarosa suplementado con 0.3% de agar. Al cabo de 24 h los halos correspondientes a las células nadadoras pudieron ser apreciados

1.8.13 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

Se extrajo ARN total de las células como se describe en (Barry et al., 1992), las células fueron cultivadas en medio líquido Burk-sacarosa o Burk-butanol según el caso, durante 48 h a 30 °C. Se eliminó la contaminación por ADN genómico con DNasa I (Thermo Scientific). Los detalles de la síntesis de ADNc y las condiciones de amplificación de qRT-PCR se llevaron a cabo según lo reportado por (Ahumada et al., 2017). Los niveles relativos de *algE1-6* y *eexD* se determinaron comparando la cantidad de cada ARNm en condiciones de enquistamiento, utilizando el ARNm de *gyrA* (Avin_15810) como control interno. La secuencia de los pares de oligos utilizados se enumeran en la Tabla 5. Estos oligos fueron diseñados utilizando el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>; con una longitud óptima de 20 bases y temperatura de amplificación de 60 °C). La validación de cada conjunto de oligos se llevó a cabo mediante la verificación de la amplificación de cada producto específico por análisis de curvas de fusión. Se realizaron tres réplicas biológicas (cultivos independientes) con tres réplicas técnicas para cada una. Se obtuvieron resultados similares para la transcripción de todos los genes medidos en las repeticiones. Se incluyó una reacción de control sin templado para cada gen. La técnica de cuantificación utilizada para analizar los datos generados fue el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado anteriormente (Livak & Schmittgen, 2001).

1.8.14 Detección de C-5 epimerasas de tipo AlgE.

Los ensayos de Western blot para detectar las C-5 epimerasas AlgE1-7 se realizaron como se describió anteriormente (Hoidal et al., 2000) utilizando los anticuerpos anti-AlgE4. Se cultivaron células de *A. vinelandii* en placas con medio Burk-butanol durante 5 días; después de este tiempo, se extrajeron las proteínas asociadas a la célula. Para ello se recogieron las células y se lavaron con 1 ml de 50 mM Tris pH 7.8, se centrifugaron durante 10 min y se resuspendieron en 0.5 ml de 50 mM Tris, 3 mM Na₂EDTA, agitadas a 250 rpm/15 min. La suspensión celular fue centrifugada, se utilizó el sobrenadante que contiene las epimerasas asociadas a la superficie del cuerpo central. Las proteínas fueron detectadas como se describe (Hoidal et al., 2000).

1.8.15 Ensayo de extensión del iniciador

El sitio de inicio de la transcripción del gen *mucR* fue mapeado por análisis de extensión del iniciador en condiciones vegetativas. El ARN total se extrajo de la cepa silvestre de *A. vinelandii* y de la cepa mutante CN100 ($\Delta algR::Km$) cultivadas en medio Burk-sacarosa durante 48 h a 30 °C. El oligo utilizado se marcó con [γ -³²P]-ATP y se utilizó la cinasa T4 (Roche). La extensión del iniciador se realizó a 42 °C utilizando la transcriptasa reversa AMV (Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor. El producto de cADN se analizó por electroforesis en un gel desnaturante de urea-poliacrilamida al 6%, en paralelo a una escalera con la secuencia de ADN producida con el mismo oligo y utilizando el equipo de secuenciación Thermo sequence. Como templado de ADN se utilizó el plásmido pJG99 que porta la región reguladora de *mucR*. Fuimos incapaces de identificar los sitios de inicio de la transcripción de *mucR* en condiciones de enquistamiento utilizando esta técnica, posiblemente porque la cantidad de ARN se encuentra limitada durante el proceso de diferenciación.

1.8.16 Expresión y purificación de la proteína AlgR-His.

La proteína AlgR fue purificada con la ayuda de una etiqueta de histidinas (6xHis) ubicada en el N-terminal (AlgR-His). Para producir esta proteína, el gen *algR* se clonó en el vector de expresión pET-21a(+) (Novagen), generando el plásmido pETR-3P. La cepa BL21 (DE3) de *E. coli* se transformó con el plásmido pETR-3P y se indujo la sobreexpresión de AlgR-His mediante la adición de 1 mM de IPTG a las células en crecimiento una vez alcanzada una densidad óptica de ($A_{600}=0,5$). Después de 4 h de inducción a 37 °C, las células se colectaron por centrifugación y se lisaron por sonicación en buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). Las células lisadas se centrifugaron durante 30 minutos a 20 000 g a 4 °C y el sobrenadante se cargó en una columna equilibrada que contenía resina de níquel Ni-NTa agarosa. La columna fue lavada 2 veces con buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) y posteriormente fue eludida con buffer de elución I: (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol). La proteína se concentró mediante el uso de tubos de filtros YM-10 (Amicon) y se almacenó en la solución de buffer de elución II: (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl 250 mM imidazol). La concentración de proteína se determinó por el método Lowry utilizando BSA como estándar (Lowry et al., 1951). La resolución de la proteína se llevó a cabo mediante SDS-PAGE obteniendo una masa molecular esperada de aproximadamente 28 kDa.

1.8.17 Ensayos de movilidad electroforética (EMSA).

Los EMSA se llevaron a cabo utilizando un método no radiactivo previamente reportado (Bustamante et al., 2008; Martínez-Flores et al., 2016). Se utilizaron fragmentos de longitud variable de la región reguladora de *mucR*, los cuales se amplificaron mediante PCR con las siguientes longitudes: i) 438 pb que contienen toda la región reguladora de *mucR*; ii) 211 pb que contienen solo el sitio de unión 2 de AlgR; iii) 114 pb que contienen solo el sitio de unión 1 de AlgR.

La reacción de unión se realizó mezclando cada uno de los productos de PCR de manera individual (100 ng) con concentraciones crecientes de la proteína AlgR-His purificada, se incubó en 20 μ l de buffer de unión (10 mM Tris (pH 8), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 5% de glicerol y 10 μ g/ml de albúmina). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida sin desnaturalizar al 6%, con buffer Tris-borato-EDTA al 0,5X. La migración de los fragmentos de ADN se visualizó tiñéndolos con bromuro de etidio y se observaron bajo la luz ultravioleta.

1.8.18 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism (versión 6.0) (GraphPad Software, La Jolla, CA). La significancia estadística se evaluó usando la prueba t de Student, donde un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo.

1.9 RESULTADOS

1.9.1 SECCIÓN 1: Efecto de la proteína MucR en condiciones de crecimiento vegetativo.

Como se mencionó anteriormente, en *P. aeruginosa* el segundo mensajero c-di-GMP provisto por la proteína de membrana interna MucR, controla la producción de alginato a nivel postraducciona (Amikam & Galperin, 2006; Hay et al., 2009). Sin embargo, en *A. vinelandii* el ortólogo de esta proteína no es necesario para la polimerización de alginato. Por tal razón, lo primero que exploramos fue si MucR en *A. vinelandii* es una proteína funcional en condiciones vegetativas. Para contestar a esta pregunta, se evaluó la función de MucR como DGC en condiciones vegetativas, mediante la caracterización de una mutante por deleción del gen *mucR* ($\Delta mucR$). Además de la cuantificación de c-di-GMP, se evaluaron fenotipos asociados al c-di-GMP como movilidad y formación de biopelícula.

1.9.1.1 Efecto de la proteína MucR en las pozas de c-di-GMP durante el crecimiento vegetativo

La proteína MucR de *A. vinelandii* es una proteína de membrana interna que posee tres dominios MHYT además de dominios tanto de síntesis (GGDEL) como de degradación (EAL) del segundo mensajero c-di-GMP (Figura 13). Los dominios MHYT están implicados en la detección de gases diatómicos como O₂, NO o el CO₂. En proteínas duales del metabolismo del c-di-GMP, es decir, que poseen tanto el dominio de síntesis como de degradación, comúnmente las actividades de estos dominios están moduladas por el dominio sensor (Mills et al., 2011). Hasta el momento, se desconoce la señal a la cual responde la activación de los dominios GGDEF o EAL en MucR; sin embargo, se ha demostrado que ambos dominios son activos en la proteína MucR de *P. aeruginosa* (Wang et al., 2015).

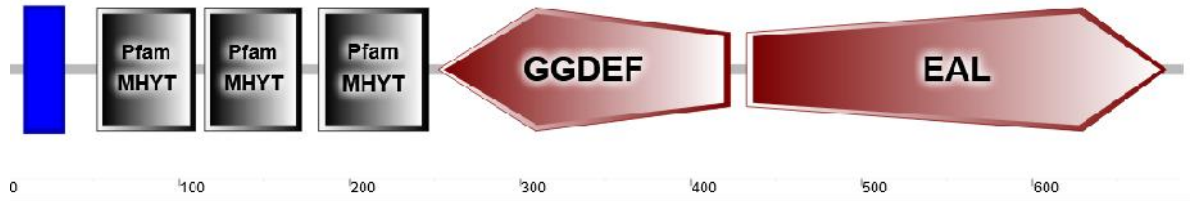


Figura 13. Arquitectura de la proteína MucR. MucR de *Azotobacter vinelandii* es una proteína transmembranal de 689aa que contiene 3 dominios sensores MHYT; el dominio de síntesis de c-di-GMP (GGDEF) y el dominio de degradación de c-di-GMP (EAL).

Para investigar si en *A. vinelandii* MucR afecta las pozas intracelulares de c-di-GMP, se cuantificaron los niveles de este segundo mensajero en condiciones vegetativas. Para este fin se prepararon extractos nucleotídicos de la cepa silvestre y de la mutante $\Delta mucR$ que fueron cuantificados por HPLC MS-MS (Spangler et al., 2010). Se analizaron los niveles de c-di-GMP en condiciones de crecimiento vegetativo (medio Burk-sacarosa) a diferentes tiempos (12, 24 y 48 h). En la cepa silvestre se observó una fluctuación en los valores de c-di-GMP: a las 12 h se aprecian valores de 1400 fmol/mg de proteína, los cuales aumentaron tres veces a las 24 h para posteriormente disminuir hasta 440 fmol/mg de proteína a las 48 h (Figura 14). De manera interesante, en la mutante $\Delta mucR$ no se apreció el aumento en las concentraciones de c-di-GMP a las 24 h, lo cual indica que MucR es la proteína responsable de dicho incremento en la concentración. En contraste, a las 48 h se observa un ligero aumento en los niveles de c-di-GMP en el fondo de la mutante $\Delta mucR$ con respecto a los valores de la cepa silvestre. Este resultado indica que MucR contribuye de manera positiva a las pozas intracelulares de c-di-GMP a las 24 h de cultivo, que corresponde a la fase estacionaria temprana; mientras que a las 48 h (fase estacionaria tardía) este efecto no se aprecia (Figura 14).

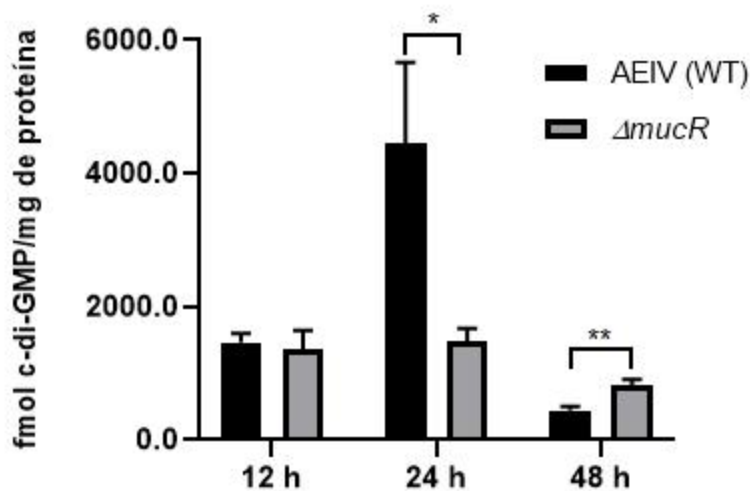


Figura 14. Efecto de MucR sobre las pozas intracelulares de c-di-GMP. Pozas intracelulares de c-di-GMP en la cepa tipo silvestre (AEIV) y en su derivada $\Delta mucR$ cultivadas en medio mínimo Burk-sacarosa (crecimiento vegetativo). Se muestra el promedio de tres repeticiones y las barras de desviación estándar. Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

1.9.1.2 La proteína MucR regula la formación de biopelícula y la movilidad tipo nado en *A. vinelandii*.

Es bien sabido que la formación de biopelículas es un proceso regulado positivamente por el c-di-GMP. Los niveles en la formación de biopelícula fueron estimados por la técnica de cristal violeta; se evaluaron a dos tiempos, a las 6 h que es la etapa de adhesión inicial y a las 96 h que es la etapa de formación de la biopelícula madura (Abee et al., 2011). Como se puede apreciar en la Figura 15A, la mutante $\Delta mucR$ muestra niveles disminuidos de biopelícula en comparación con la cepa de tipo silvestre AEIV. Además, en la cepa complementada ICM09 (*mucR+*) los niveles de formación de biopelículas son similares a los de la cepa silvestre. Este resultado confirma el papel que tiene MucR en este proceso, que se relaciona con su actividad de DGC detectada en estas condiciones (crecimiento vegetativo). Durante el crecimiento vegetativo de otras especies bacterianas, se ha reportado que bajos niveles de c-di-GMP favorecen la movilidad (Boyd & O'Toole, 2012). En concordancia con estos resultados, a las 24 h la mutante $\Delta mucR$ mostró un aumento en su capacidad de nado en comparación con la cepa silvestre (Figura 15B), correlacionando con

la disminución en las pozas de c-di-GMP detectadas en este fondo genético. En conjunto, estos resultados indican que la proteína MucR modula los niveles de c-di-GMP, actuando como diguanilato-ciclasa en condiciones vegetativas, afectando fenotipos como la movilidad y la formación de biopelícula.

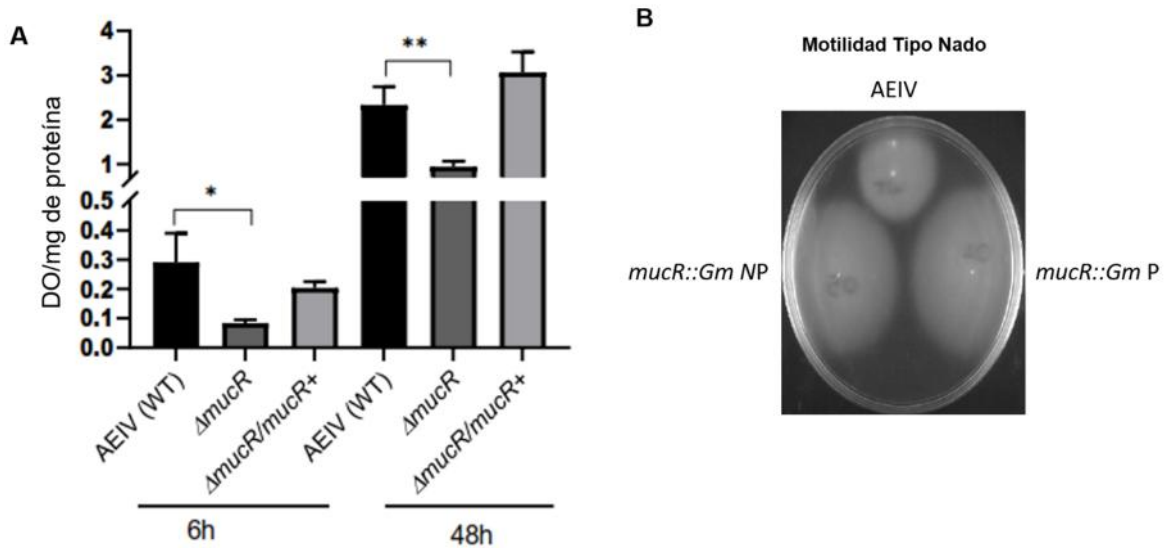


Figura 15. Efecto de MucR sobre el desarrollo de biopelícula y movilidad en *A. vinelandii*. **A.** Formación de biopelícula, estimado por el método de cristal violeta, por la cepa silvestre AEIV (WT), su derivada mutante $\Delta mucR$ y en la cepa complementada ICMO9 ($mucR^+$); **B.** Movilidad tipo nado en agar suave de la cepa silvestre AEIV y de las cepas carentes del gen *mucR*. La orientación del cassette de Gm que se utilizó de marcador en la construcción de las mutantes *mucR* está en la misma orientación (No polar) o en la orientación contraria (Polar). Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

1.9.2 SECCIÓN 2: Efecto de la proteína MucR en condiciones de diferenciación celular.

Como se mencionó en antecedentes, en un trabajo previo habíamos observado que en ausencia de la proteína MucR, la célula es incapaz de diferenciarse y formar células resistentes a la desecación. Por tal razón, exploramos a detalle la función de esta proteína reguladora en el proceso de diferenciación de *A. vinelandii*.

1.9.2.1 MucR es esencial para el proceso de enquistamiento.

Para establecer de manera contundente el papel esencial de MucR en el enquistamiento, realizamos ensayos de enquistamiento en la cepa mutante $\Delta mucR$ y en su derivada complementada; los resultados fueron comparados con los de la cepa silvestre. Los ensayos de enquistamiento confirmaron que en la mutante $\Delta mucR$ se reduce aproximadamente 100 veces la capacidad de formar quistes maduros resistentes a la desecación (Figura 16). En tanto que la capacidad de enquistamiento se recuperó en la cepa complementada. Estos resultados son concluyentes del rol esencial de la proteína MucR durante la diferenciación celular de *A. vinelandii*.

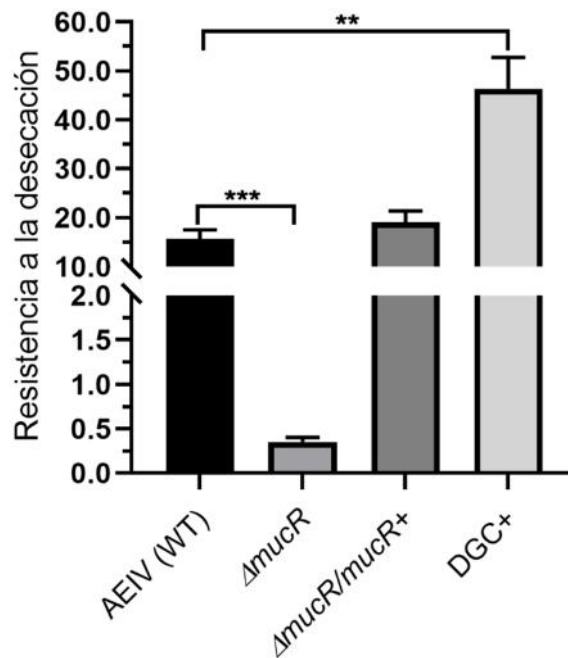


Figura 16. MucR es necesaria para la formación de quistes maduros. Ensayo de resistencia a la desecación de la cepa silvestre AEIV, de su derivada $\Delta mucR$, de la cepa complementada ($\Delta mucR/mucR^+$) y de una cepa con altos niveles de c-di-GMP (cepa que sobreexpresa la DGC Avin_420 reportada en (Ahumada et al., 2020) (DGC⁺)). Se grafica el porcentaje de células recuperadas después de haber sido sometidas a un ensayo de resistencia a la desecación por 5 días a 30 °C. Se presenta el promedio de tres réplicas biológicas y las barras de desviación estándar. Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma **, P <0.01; ***, P <0.0001.

1.9.2.2 MucR participa en la acumulación de c-di-GMP durante la inducción a la diferenciación celular

Existen varios reportes que relacionan al segundo mensajero c-di-GMP con el proceso de diferenciación celular en algunos géneros bacterianos (Bush et al., 2017; Gallagher et al., 2020; Skotnicka, et al., 2016). Dado el rol esencial de la proteína MucR en la diferenciación celular, se analizaron los niveles del segundo mensajero a lo largo del proceso de diferenciación celular (Figura 17), tanto en la cepa silvestre como en la mutante $\Delta mucR$. Este análisis nos ayudaría a contestar dos preguntas: si existen fluctuaciones de c-di-GMP a lo largo del enquistamiento de *A. vinelandii* y si la actividad de la proteína MucR es necesaria para mantener dichos niveles.

Después de la inducción al enquistamiento, *A. vinelandii* experimenta importantes cambios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos. A partir de las 4 h de inducción hay un cese en el consumo de oxígeno, en la capacidad de fijar nitrógeno y en la síntesis de ADN. Estos cambios continúan a lo largo de este proceso que dura 5 días. Los niveles totales de c-di-GMP durante la inducción de enquistamiento se cuantificaron en la etapa temprana (0 y 6 h), media (12 y 24 h) y tardía (48 y 96 h). Como se puede observar en la Figura 17, en la cepa silvestre existe un marcado aumento de tres veces en las concentraciones de c-di-GMP a las 6 h; posteriormente, a las 12 h estos niveles se reducen a la mitad y en tiempos subsecuentes las concentraciones de c-di-GMP se mantienen más o menos constantes.

En contraste, en ausencia de la proteína MucR se observa una marcada disminución en las pozas de c-di-GMP en las primeras 6 h de inducción y los niveles se mantiene bajos con respecto a la cepa silvestre durante el resto del proceso de diferenciación hasta las 96 horas. El marcado aumento en los niveles de c-di-GMP a las 6 h de inducción al enquistamiento, parece ser necesario para disparar el proceso de diferenciación celular. Además, podemos concluir que este efecto se debe a la actividad de la proteína MucR, pues en la mutante no se observa un aumento, al contrario, se observa una degradación de este segundo mensajero.

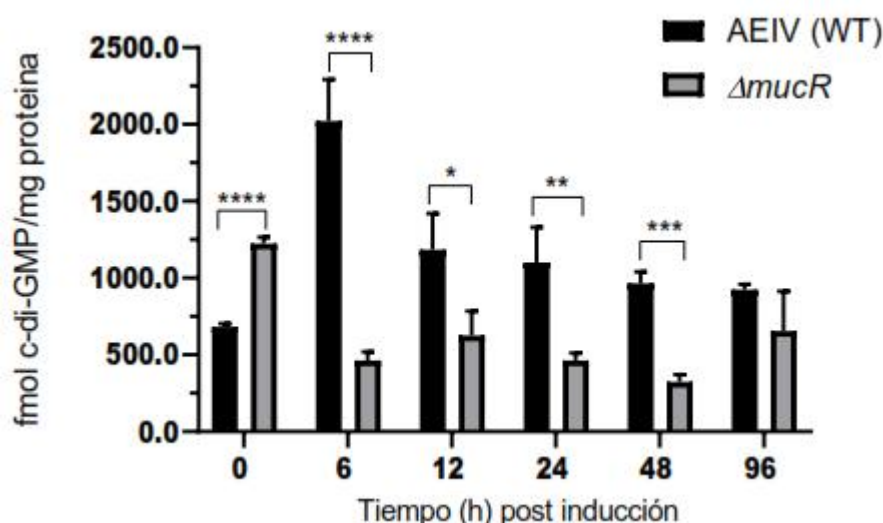


Figura 17. MucR contribuye en la reserva intracelular de c-di-GMP durante la diferenciación celular. Se muestran los niveles de c-di-GMP en las cepas de tipo silvestre (AEIV) y $\Delta mucR$ en condiciones de crecimiento vegetativo (medio Burk-sacarosa; tiempo 0) y de inducción al enquistamiento (medio Burk-butanol; a partir de las 6 h). Se aplicó una prueba de t para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$.

1.9.2.3 MucR no afecta los niveles de alginato durante el proceso de enquistamiento

Debido a que nuestros resultados señalan a MucR como esencial para la formación de quistes resistentes a la desecación, investigamos si esto se debía a un posible efecto positivo sobre la producción de alginato durante la diferenciación celular. Para tal fin, cuantificamos los niveles de este polisacárido en condiciones de enquistamiento tanto en la cepa silvestre AEIV como en la mutante $\Delta mucR$ y en su derivada complementada ($mucR^+$). Como se muestra en la gráfica de la Figura 18, la producción de alginato en la mutante $\Delta mucR$ no muestra cambios notables en comparación con los de la cepa silvestre AEIV, a los dos días de haber inducido el enquistamiento; además, podemos apreciar que en la cepa complementada con el gen $mucR$ los niveles de alginato incluso se aumentan, esto posiblemente se debe a un aumento en la dosis génica del gen $mucR$. Estos resultados confirman que en *A. vinelandii* MucR no es esencial

para la polimerización de alginato en crecimiento vegetativo ni durante la diferenciación celular pero que si es necesaria para el control de otro proceso indispensable para la formación de quistes maduros.

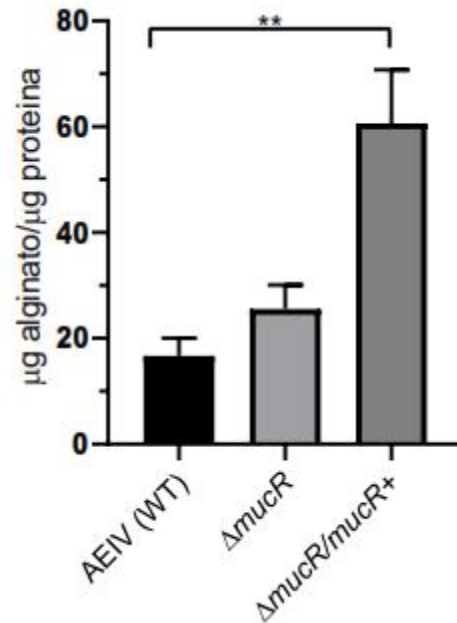


Figura 18. Efecto de MucR sobre la producción de alginato en condiciones de enquistamiento. Producción específica de alginato en la cepa silvestre (WT), en su derivada $\Delta mucR$ (ICM01) y en la cepa complementada $\Delta mucR/mucR^+$ (ICM09). Las células fueron cultivadas en placas de medio Burk-butanol por 48 h. Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma **, $P < 0.01$.

1.9.2.4 Morfología de los quistes de la mutante *mucR*.

Para conocer si la pérdida de resistencia a la desecación era el resultado de una estructuración atípica en los quistes de la cepa mutante $\Delta mucR$, se decidió evaluar su morfología mediante microscopía electrónica. Los quistes de la mutante *mucR* muestran una estructura alterada en comparación con los quistes de la cepa silvestre AEIV (Figura 19). Las capas que protegen al cuerpo central no están presentes en la cepa mutante $\Delta mucR$, fenotipo que explica la falta de resistencia a la desecación. Este fenotipo de quistes desnudos es típico de cepas no productoras de alginato. Debido a que la mutante $\Delta mucR$ muestra niveles silvestres de este polímero, exploramos entonces si la proteína MucR estaba involucrada en la estructuración de la cápsula.

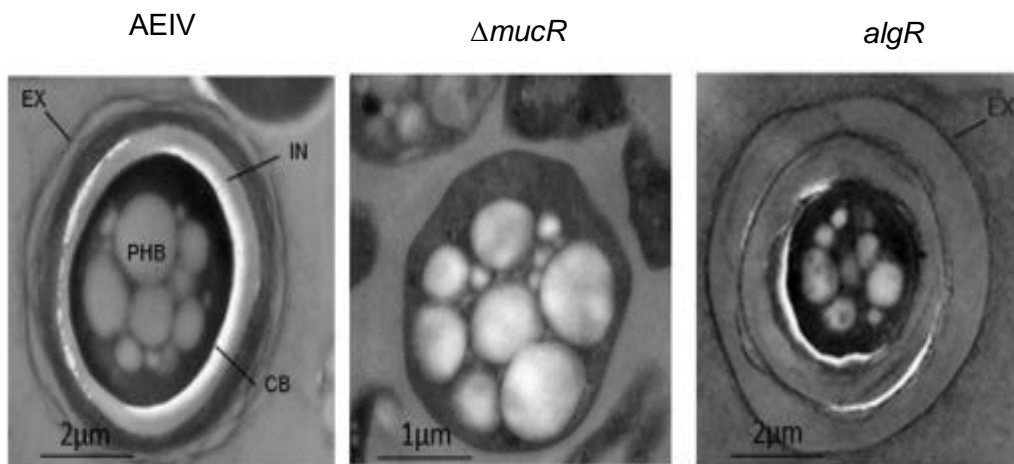


Figura 19. Microscopía electrónica de quistes de *A. vinelandii*. Se muestran las células diferenciadas formadas por la cepa silvestre AEIV, (WT), $\Delta mucR$ (ICMO1) y $\Delta algR$ - (CNR100). Abreviaturas: IN, intina; EX, exina; CB, cuerpo central. Las células fueron cultivadas en medio líquido Burk-butanol por 5 días.

1.9.2.5 La proteína MucR regula de manera positiva las epimerasas

Derivado de lo anterior, se decidió investigar si el fenotipo del quiste desnudo se debía a la ausencia de las epimerasas extracelulares (MEs) AlgE1-AlgE7, que como ya se explicó en los antecedentes son necesarias para una correcta estructuración de la cápsula que envuelve al quiste (Gimmestad et al., 2006). Para tal fin, realizamos ensayos tipo Western Blot para evaluar el posible efecto de MucR sobre las MEs secretadas al medio. Se extrajeron proteínas

adheridas a las células inducidas a enquistamiento y se utilizó un anticuerpo anti-AlgE4 para la detección de las MEs. Las epimerasas AlgE1-7 poseen una estructura modular, de tal forma que el anticuerpo anti-AlgE4 tiene la capacidad de detectar al resto de las epimerasas (Hoidal et al., 2000). Como se puede observar en la Figura 20, se detectaron 5 bandas correspondientes a las epimerasas asociadas a la superficie en la cepa silvestre AEIV, mientras que, en la mutante $\Delta mucR$ solo se detectó una banda, lo que indica la participación de la proteína MucR en la regulación positiva de las MEs. Se ha demostrado en estudios anteriores (Hoidal et al., 2000) que las proteínas AlgE1-AlgE7 poseen un patrón de migración anormal, que no permite su adecuada identificación basándose en su masa molecular, por lo que aun desconocemos cuales son las epimerasas que se encuentran bajo el control de MucR. Además incluimos en este experimento el perfil de una mutante que carece del factor sigma de estrés RpoS, el cual es esencial para la expresión de las MEs (Moreno et al., 2018); como era de esperarse en esta cepa tampoco se detectaron las MEs.

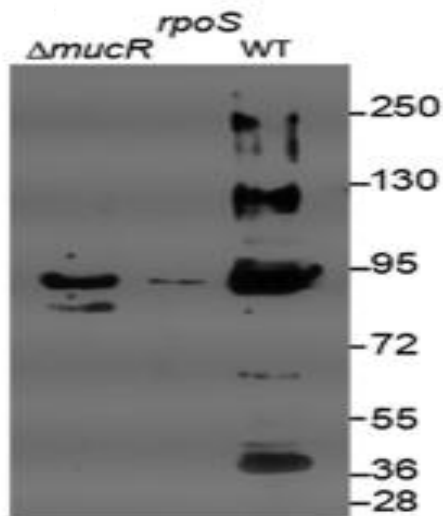


Figura 20. Efecto de MucR sobre las epimerasas AlgE1-7. Detección de las epimerasas AlgE1-AlgE7 en las cepas $\Delta mucR$, $\Delta rpoS$ y silvestre AEIV mediante ensayos tipo Western blot. Se utilizaron extractos totales de las proteínas asociadas al quiste, después de 5 días de inducción a enquistamiento (medio mínimo adicionado con 0.2% de *n*-butanol).

1.9.2.6 La expresión de las epimerasas AlgE1-6 se encuentra regulada por la proteína MucR

El resultado anterior mostró que la detección de las epimerasas AlgE1-7 se ve afectada en ausencia de la proteína MucR. Para investigar si este resultado se debía a un defecto a nivel transcripcional y/o a un defecto en el sistema de secreción de estas proteínas, decidimos cuantificar los niveles de los ARNm, para tal fin se utilizaron dos pares de oligos previamente reportados (Moreno, et al., 2018) capaz de alinearse con las epimerasas *algE1-6* (pero que no detecta el gen *algE7*) y con el transportador de éstas, *eexD*. Como se puede apreciar en la Figura 21A, los niveles del mensajero de las epimerasas se abatieron en la cepa mutante $\Delta mucR$, en comparación con la cepa silvestre, mientras que en la cepa complementada con una copia del gen *mucR* silvestre los niveles de *algE* incluso se ven aumentados; esto posiblemente se deba a un aumento de las copias génicas de *mucR* en esta cepa. Por otro lado, la expresión del ARN mensajero del transportador *eexD* también se ve ligeramente disminuida (aprox. 20%), con relación a la cepa AEIV, estos niveles se restablecen en la cepa complementada $\Delta mucR/mucR$ (Figura 21B), incluso rebasando los niveles de la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados nos indican claramente que la proteína MucR es esencial para la transcripción de los genes de las epimerasas *algE*, no así para la expresión de los genes que codifican su transportador.

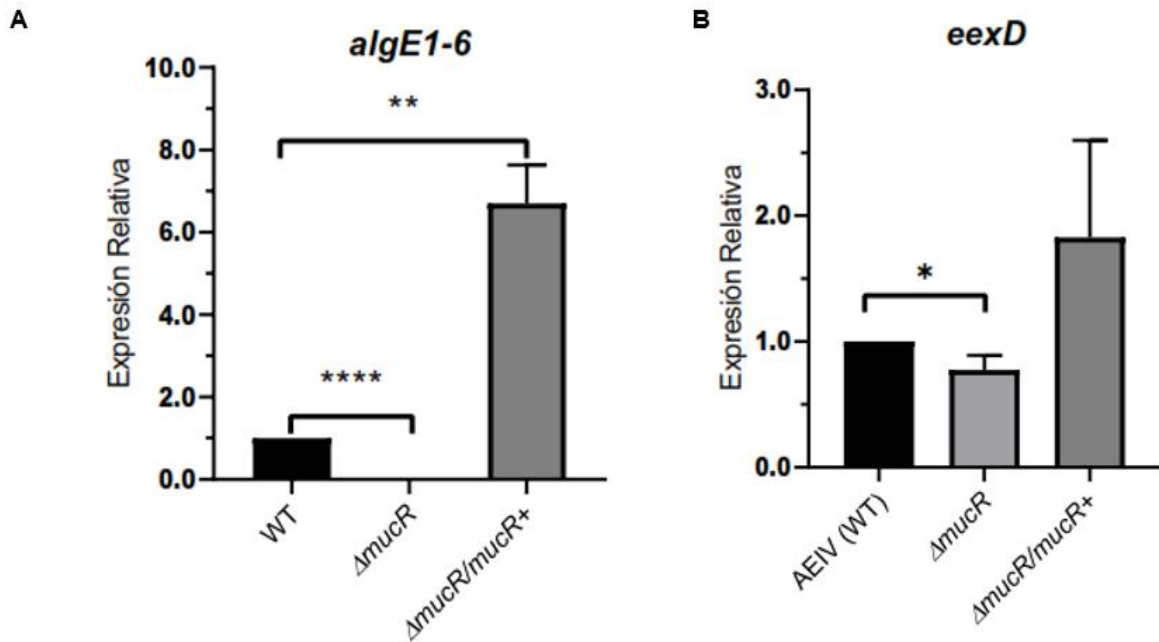


Figura 21. Efecto de MucR sobre la transcripción de los genes de las epimerasas y de su transportador. A. Expresión relativa de los genes *algE1-6* y **B)** del gen *eexD*, en la cepa silvestre, en su derivada mutante $\Delta mucR$ y en la cepa complementada $\Delta mucR/mucR^+$. Las células se cultivaron en condiciones de inducción al enquistamiento, en medio líquido Burkbutanol por 48 h. La cantidad del ARNm de *algE1-6* y *eexD* se normalizó utilizando de referencia la expresión del gen *gyrA*. Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.00001$.

1.9.3 SECCIÓN 3: Estudio de la regulación transcripcional del gen *mucR*.

Nuestros resultados anteriores indican claramente que la proteína MucR de *A. vinelandii* es crucial para el desarrollo de quistes que resisten desecación. Por tal razón, quisimos investigar la regulación transcripcional del gen *mucR*; esto incluyó el análisis de su región promotora, el estudio de su regulación diferencial a la inducción del enquistamiento y la caracterización de posibles reguladores transcripcionales. Los resultados se desglosan en los párrafos siguientes.

1.9.3.1 Identificación de los inicios de transcripción del gen *mucR*

Un análisis del contexto génico de *mucR* reveló que se transcribe como una unidad monocistrónica, siendo su región reguladora de un tamaño de 260 pb (Figura 22A). Para establecer el inicio de la transcripción de *mucR* se realizaron experimentos de extensión del iniciador utilizando ARN de células crecidas en condiciones de vegetativas (Burk-sacarosa); se identificaron así dos inicios de la transcripción (Figura 22). No obstante, un análisis de las regiones -10 y -35 de estos dos inicios de transcripción no muestran secuencias aparentes de reconocimiento por ningún factor sigma. Vale la pena mencionar que intentamos sin éxito determinar los inicios de transcripción en condiciones de enquistamiento. Es posible que esto se deba a la baja cantidad de ARN extraído en estas condiciones aunado a la baja expresión de *mucR*, lo cual es habitual para genes reguladores.

El análisis de la región reguladora permitió identificar dos sitios potenciales de reconocimiento del regulador transcripcional AlgR (Figura 22A), con base en la secuencia consenso de unión de AlgR en *P. aeruginosa* (CCGTTCGTC) (Kong et al., 2015). Como se recordará, AlgR es un regulador transcripcional esencial para el enquistamiento en *A. vinelandii*. Por otro lado, el análisis de la región reguladora de *mucR* (sitio web <http://www.prodoric.de/vfp/>) nos permitió identificar, además, 3 sitios putativos de unión al regulador transcripcional FleQ con una calificación significativa de 7 (Figura 22A). Este resultado sugiere que FleQ pudiera activar la transcripción de *mucR*. De manera interesante, FleQ es un activador/represor transcripcional cuya actividad está regulada por c-di-GMP. Sería interesante establecer si la expresión de *mucR* responde a los niveles del mismo c-di-GMP a través de FleQ.

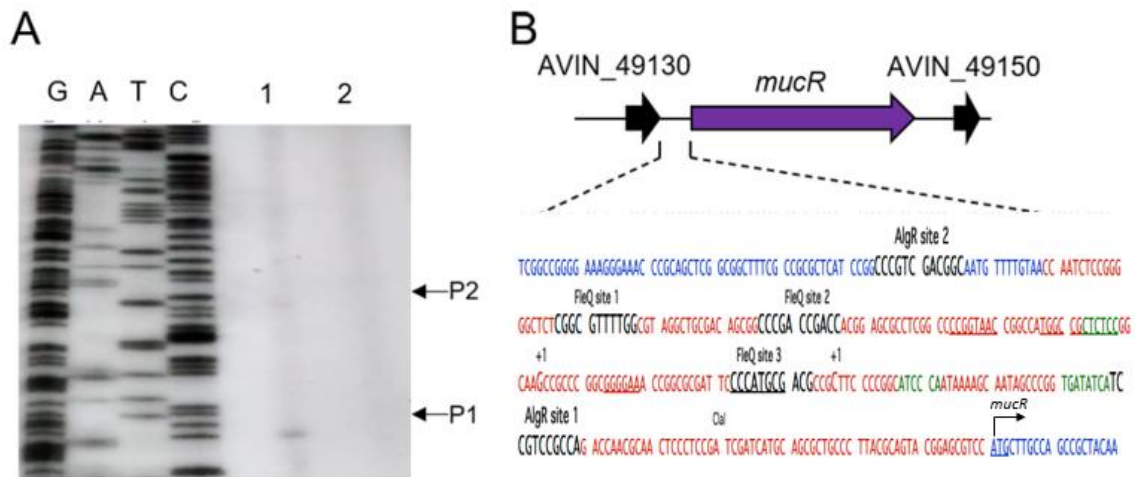


Figura 22. Identificación del sitio de inicio de transcripción de *mucR* mediante extensión del iniciador. Se utilizó ARN de células cultivadas en medio Burk-sacarosa por 48 h y un primer complementario a *mucR*. **A.** Los cADNs obtenidos se resolvieron en un gel de poliacrilamida, junto con la secuencia de ADN de la región reguladora del gen *mucR*. Se muestran los sitios de inicio de la transcripción (P1 y P2) identificados en la cepa silvestre AEIV (carril 1) y en la mutante $\Delta algR$ (carril 2). **B.** Secuencia nucleotídica de la región reguladora de *mucR*. Los dos inicios de la transcripción están indicados con +1. El codón de inicio de la traducción se indica en azul y subrayado. Se indican los tres sitios putativos de reconocimiento de FleQ y los dos de AlgR.

1.9.3.2 El regulador transcripcional AlgR regula la expresión del gen *mucR*.

Como se mencionó en antecedentes, el regulador transcripcional AlgR es esencial para la formación de quistes maduros en *A. vinelandii* (Núñez et al., 1999). En este trabajo, se demostró que AlgR era necesario para estructurar la cubierta del quiste, pues en ausencia de AlgR solo se observa una exina incipiente. En el presente trabajo confirmamos este fenotipo pues las células diferenciadas de la mutante $\Delta algR$ carecen de una cápsula totalmente estructurada (Figura 19) (Núñez et al., 1999). Sin embargo, hasta antes de este trabajo, se desconocía el mecanismo de dicha regulación, mucho menos blancos directos de regulación de AlgR. Dado que ambos reguladores, MucR y AlgR afectan la estructuración de las capas del quiste y dado el hallazgo de posibles sitios de pegado de AlgR en la región reguladora de *mucR*, exploramos si *mucR* es blanco de control del regulador de respuesta AlgR.

Como un primer acercamiento, realizamos el ensayo de extensión del iniciador utilizando ARN de la cepa *algR*. Como se observa en la Figura 22B, los dos inicios de la transcripción de *mucR* identificados en la cepa silvestre desaparecen en la cepa que carece del regulador de respuesta AlgR, lo que confirma una regulación positiva de *mucR* por este activador (Figura 22A). El efecto positivo de AlgR sobre la transcripción de *mucR*, se confirmó mediante ensayos de qPCR, tanto en condiciones vegetativas como en condiciones de inducción al enquistamiento. Como se puede observar en la Figura 23A, la cantidad del ARNm de *mucR* se disminuye aproximadamente 40% en condiciones de crecimiento vegetativo y en condiciones de inducción al enquistamiento, con respecto a los niveles observados en la cepa silvestre AEIV. Este resultado indica que AlgR regula positivamente, aunque de manera parcial la transcripción del gen *mucR*. Esto contrasta con el resultado obtenido de extensión del iniciador en donde ambos inicios de transcripción desaparecen en la mutante $\Delta algR$, sugiriendo una regulación positiva total. Por tal razón, es posible que exista un promotor adicional que dirija la transcripción de *mucR*, que no logramos detectar en nuestro ensayo y que sea independiente del regulador de respuesta AlgR.

Una de las estrategias de control durante la diferenciación celular en bacterias es favorecer la expresión reguladores clave en este proceso. De manera interesante, en un trabajo previo realizado en el laboratorio se describió que la proteína AlgR se acumula 22 veces más en células inducidas a enquistamiento que en células en crecimiento vegetativo (Chowdhury-Paul et al., 2018). Dado el control positivo de AlgR sobre la transcripción del gen *mucR* quisimos averiguar si la expresión de *mucR* podría favorecerse en condiciones de enquistamiento. Ensayos de qPCR confirmaron que, efectivamente, la expresión de *mucR* aumenta a razón de seis veces en condiciones de enquistamiento respecto al crecimiento vegetativo en la cepa AEIV (Figura 23B).

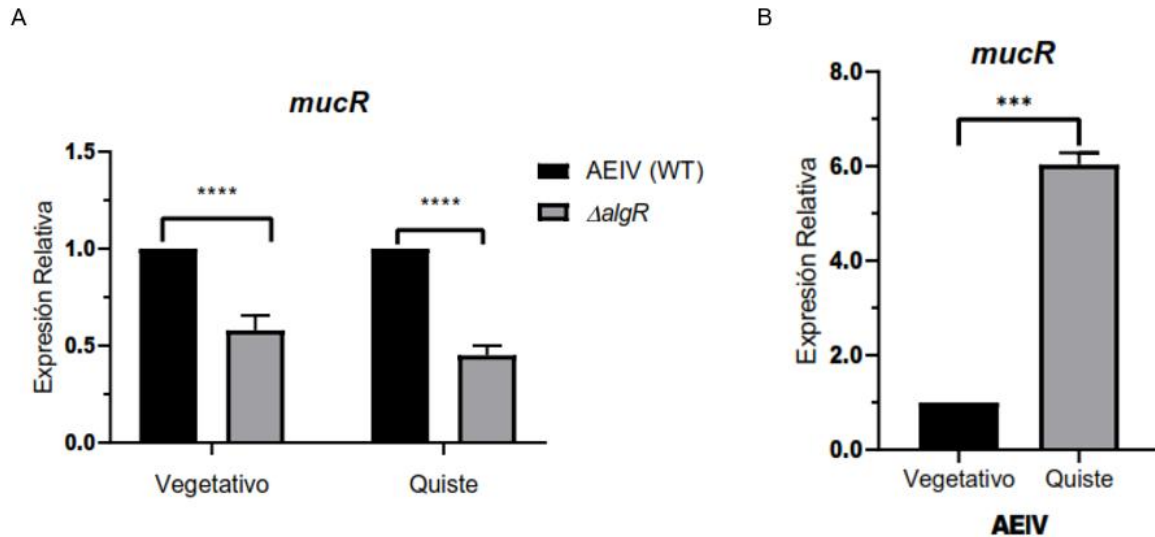


Figura 23. Niveles de expresión relativa del gen *mucR* mediante qRT-PCR. A. Efecto de AlgR en la transcripción de *mucR*. Los niveles relativos de mRNA de *algR* fueron estimados en la mutante $\Delta algR$ y comparados con los de la cepa silvestre, en condiciones de crecimiento vegetativo o en inducción al enquistamiento. **B.** Expresión de *mucR* en condiciones de crecimiento vegetativo y en inducción al enquistamiento. La cantidad del ARNm se normalizó utilizando de referencia la expresión del gen *gyrA*. Análisis Estadístico. Se aplicó una prueba de *t* para el análisis estadístico, la significancia se representa de la siguiente forma ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$.

1.9.3.3 AlgR regula la transcripción del gen *mucR* por unión directa a su promotor

Atendiendo a los anteriores resultados y a la presencia de sitios putativos de unión de AlgR en la región reguladora de *mucR*, nos propusimos investigar si la regulación de *mucR* por AlgR es directa; para medio de ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Se utilizó el plásmido pETR-3P (Biosciences), para la expresión de la proteína AlgR, la cual fue posteriormente purificada para el ensayo EMSA.

Se amplificó un fragmento de 438 pb de la región reguladora de *mucR* el cual posee las dos secuencias putativas de unión de AlgR, la proximal, BS1 y la distal, BS2. El ensayo de unión demostró que AlgR se une específicamente a la región reguladora de *mucR* en concentraciones de 0.52 a 1.4 μM . Para explorar aún más si AlgR podía reconocer ambos sitios (BS1 y BS2) por separado, se amplificaron dos fragmentos más (de 114 y 211 pb, respectivamente) que portan los sitios individuales de unión a AlgR. AlgR fue

capaz de reconocer ambos sitios por separado (Figura 24 C y D), la unión resultó ser más afín por el sitio distal BS2 (Figura 24C y 24D). Como control negativo se utilizó un fragmento del gen *Avin_05510* el cual no mostró ningún cambio en su movilidad electroforética. En conjunto, estos resultados indican claramente que AlgR reconoce y activa la transcripción del gen *mucR*.

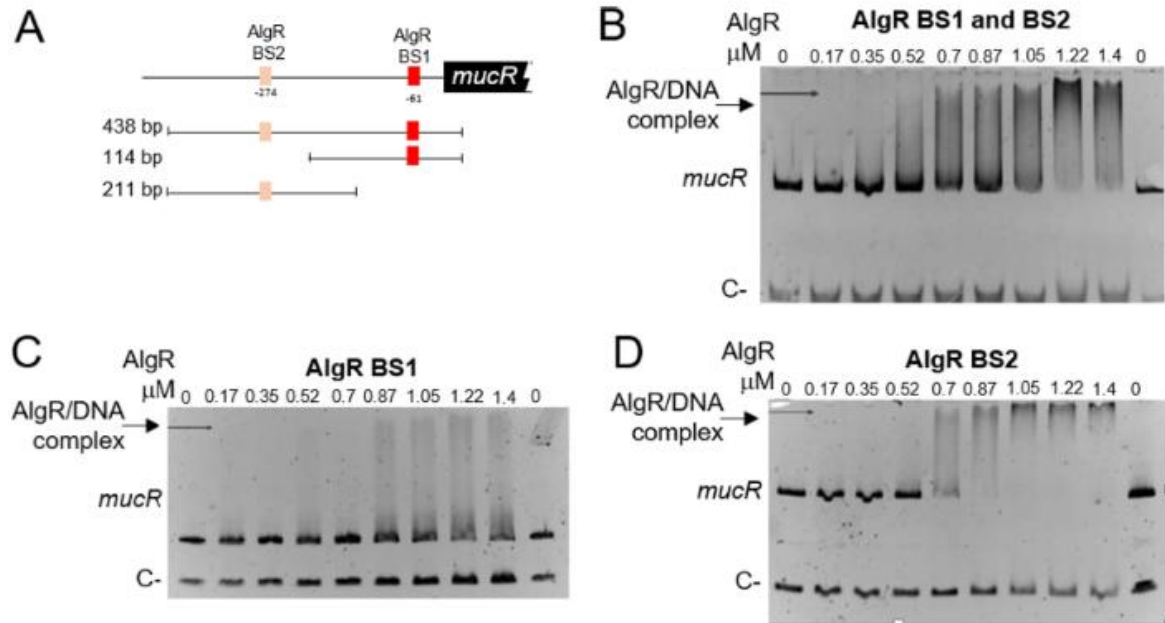


Figura 24. AlgR reconoce directamente la región reguladora de *mucR*. **A.** Disposición de los dos probables sitios de pegado de AlgR, BS1 y BS2, a la región reguladora de *mucR*. Se muestran los fragmentos utilizados en los ensayos tipo EMSA. **B, C y D.** Ensayos tipo EMSA para evaluar la unión de la proteína AlgR a la región reguladora de *mucR* en los sitios BS1 y BS2, **C.** Solo BS1 y **D.** Solo BS2. El control negativo corresponde a un fragmento de 100 pb del gen *Avin_05510*.

1.10 Discusión

En bacterias, diversas moléculas señalizadoras, entre ellas los segundos mensajeros, tienen la capacidad de regular distintos fenotipos. El c-di-GMP es un segundo mensajero reconocido por su versatilidad al regular virulencia, ciclo celular, movilidad y formación de biopelículas. Altos niveles intracelulares de c-di-GMP se relacionan con la formación de biopelículas o con el estilo de vida sésil, y bajos niveles de c-di-GMP están relacionados con la movilidad o el estilo de vida planctónico (Ha & O'Toole, 2015; Opoku-Temeng & Sintim, 2017). Durante el crecimiento vegetativo en *A. vinelandii*, pudimos observar cómo los niveles de c-di-GMP fluctúan teniendo la mayor concentración a las 24 h, mismos que se relacionan con la formación de biopelículas, En este trabajo además, caracterizamos el papel de la proteína MucR que actúa como una DGC activa, pudimos establecer que en ausencia de *mucR* los niveles de formación de biopelícula disminuyen. Los tiempos evaluados (6 y 48 h) nos permiten proponer que MucR tiene un papel fundamental durante el establecimiento de la biopelícula y su maduración, fenotipo conservado para su homólogo en *P. aeruginosa* (Petrova & Sauer, 2009). Aunado a este resultado, pudimos observar como en la mutante $\Delta mucR$ donde los niveles de c-di-GMP están disminuidos el estilo de vida planctónico predomina, pues las cepas son más móviles en comparación con la cepa de silvestre.

El c-di-GMP se ha vinculado con la regulación durante la diferenciación celular en varios modelos bacterianos (Konovalova et al., 2010; Skotnicka, et al., 2016), por ejemplo, en *M. xanthus*, se requiere un umbral mínimo de los niveles de c-di-GMP para la formación de cuerpos fructíferos. Durante este proceso, el c-di-GMP se acumula gradualmente hasta 20 veces una vez iniciada la limitación de nutrientes, a expensas de la actividad de la DGC DmxB; esto favorece la acumulación de un exopolisacárido esencial para la formación de cuerpos fructíferos (Skotnicka, et al., 2016). En este trabajo demostramos que el proceso de desarrollo del quiste en *A. vinelandii* es regulado por la señalización del c-di-GMP a través de la proteína MucR (Figura 25). La ausencia de MucR reduce la concentración de este segundo mensajero a lo largo de todo

el proceso de diferenciación e impide el correcto ensamblaje de las capas de alginato que recubren al quiste. En la hipótesis de este trabajo propusimos que la relación entre el c-di-GMP y el enquistamiento sería a nivel de la producción de alginato, mediante el módulo de control comprendido por la DGC MucR, basándonos en lo reportado en *P. aeruginosa*. Encontramos que, a diferencia de lo que se observa en *P. aeruginosa*, MucR no es esencial para la polimerización del alginato en *A. vinelandii*, sin embargo, fué necesario para la estructuración de la cubierta de alginato, característica de los quistes maduros. Dado que la estructuración de la capa de alginato requiere la actividad de las epimerasas extracelulares, evaluamos si la abundancia y/o localización de estas proteínas se veía alterada en ausencia de MucR. Encontramos que MucR es esencial para la transcripción de los genes *algE1-6* y consecuentemente, para la presencia de epimerasas AlgE en la superficie de los quistes maduros. Para que la proteína MucR pueda regular la transcripción de los genes *algE1-6* debe alterar la actividad de un receptor de c-di-GMP que pueda actuar como regulador de la transcripción, el cual no ha sido descrito en *A. vinelandii*. Sin embargo, *P. aeruginosa* tiene uno de los receptores de c-di-GMP mejor caracterizados, el regulador maestro flagelar FleQ (Baraquet et al., 2012; Matsuyama et al., 2016). A niveles bajos de c-di-GMP este receptor activa la expresión génica flagelar, mientras que cuando los niveles de c-di-GMP aumentan se activan los genes *pel* implicados en la biosíntesis del exopolisacárido Pel (Baraquet & Harwood, 2016). *A. vinelandii* tiene un ortólogo FleQ con el que comparte 77% de identidad con FleQ de *P. aeruginosa*. Hemos identificado sitios putativos de unión de FleQ en la región reguladora de *algE1-7* en *A. vinelandii*, utilizando el software Virtual Footprint (Munch et al., 2005). Posiblemente MucR esté regulando la expresión de estos genes mediante la modulación de la actividad de FleQ, sin embargo, esto debe probarse experimentalmente.

Dado que la actividad de las C5 epimerasas introducen bloques de residuos gularónicos (G) en las cadenas de alginato y dado que MucR es esencial para la expresión de las C5 epimerasas, nuestros resultados indican

que la proteína MucR favorece la producción de alginatos con un alto contenido de residuos G, que en presencia de iones Ca^{+2} , favorece la formación de geles de estructura rígida característica de la cápsula que envuelve al quiste de *A. vinelandii*. La envoltura del quiste es una estructura compleja en la que el alginato es uno de los principales componentes, sin embargo, también contiene otros carbohidratos, proteínas, lípidos de alquil-resorcinol y ADN. La formación de esta estructura es un proceso gradual de capas discontinuas alrededor de la célula que se produce principalmente durante las primeras 30-48 h de diferenciación (Sadoff, 1975), por lo que la capa más externa, la exina, es la primera en formarse, seguida por la intina. Las C-5 epimerasas, como AlgE1, AlgE2, AlgE4 y AlgE6, generan diferentes variedades de estructuras de alginato presentes en la capa del quiste, se liberan de las células enquistadas principalmente entre 12 y 36 h después de la inducción (Hoidal et al., 2000).

Nuestros resultados muestran que la MucR afecta las pozas de c-di-GMP, incluso en las primeras etapas de diferenciación. De hecho, el pico de c-di-GMP observado en las primeras 6 h en la cepa de silvestre no se produce en la mutante $\Delta mucR$, lo que sugiere que tal aumento en la poza de este segundo mensajero es un requisito para la formación exitosa de un quiste maduro. Se desconoce si MucR solamente se requiere para la modificación de las cadenas de alginato contenidas en las capas de exina e intina del quiste o si también participa en la síntesis de otros componentes de la capa del quiste. Dados los importantes cambios fisiológicos y morfológicos que se producen durante las primeras etapas de la diferenciación, como la pérdida de los flagelos o el bloqueo de la síntesis de ADN, no podemos descartar la existencia de procesos adicionales bajo el control de la cascada reguladora de señalización de c-di-GMP iniciada por MucR. Nuestros resultados sugieren fuertemente la cascada de regulación MucR-FleQ-*algE1-6* para el control de la envoltura del quiste maduro; sin embargo no descartamos la posibilidad de que las pozas de c-di-GMP generadas por MucR tengan efectos globales e involucren más vías de control que redunden en la regulación de los genes *algE1-6* y de otros blancos. Como se verá en la sección siguiente, la proteína RimK, capaz de unir c-di-

GMP, regula la actividad ribosomal y con ello ejercería un efecto pleiotrópico en los procesos celulares. Por tal razón, sería interesante establecer el regulón de la DGC MucR para definir claramente sus blancos de control y su posible conexión con el sistema RimBK descrito mas adelante.

En nuestro grupo de trabajo recientemente se demostró que en *A. vinelandii*, el c-di-GMP favorece la síntesis de largas cadenas de alginato de forma dependiente al módulo de control AvGReg-MucG. AvGReg es una DGC con un sensor acoplado a globina necesario para la producción de alginato, mientras que MucG es una PDE que regula negativamente esta ruta biosintética (Ahumada-Manuel et al., 2020). Estas proteínas parecen actuar en la etapa de polimerización del alginato, mientras que MucR estaría actuando en la etapa de modificación del polisacárido, una vez secretado al medio extracelular. De esta manera MucG y la DGC AvGReg afectan la polimerización del alginato, probablemente mediante la activación de la copolimerasa Alg44. Por otra parte, MucR junto con un receptor de c-di-GMP aún por identificar, afectan la modificación del alginato regulando la transcripción de los genes que codifican las C5 epimerasas. Este esquema regulador sugiere que no solo la cantidad, sino también las propiedades físicas de este polímero están estrechamente controladas en respuesta a las condiciones ambientales.

En *P. aeruginosa*, AlgR es un regulador transcripcional clave necesario para la expresión de múltiples factores de virulencia, incluido el alginato (Ma et al., 1998; Okkotsu et al., 2013) y para modular las pozas de c-di-GMP mediante la transcripción de *mucR* (Kong et al., 2015). Aunque en *A. vinelandii* AlgR no es esencial para la producción de alginato, es necesario para estructurar la cápsula del quiste (Núñez et al., 1999). En el presente estudio encontramos que, al igual que en *P. aeruginosa*, *mucR* de *A. vinelandii* está directamente regulado por AlgR. La abundancia de la proteína AlgR es 22 veces mayor durante la diferenciación celular en comparación al crecimiento vegetativo (Chowdhury-Paul et al., 2018), esto explica los niveles altos de transcripción de *mucR* durante la diferenciación celular favoreciendo la acumulación de c-di-GMP y la progresión del ciclo celular. En *P. aeruginosa*, el estado de fosforilación de AlgR

por la histidina-cinasa FimS (también llamada AlgZ) conduce a la regulación diferencial de los genes blanco. En su forma fosforilada, AlgR es necesaria para la activación/modulación transcripcional de los genes necesarios para la síntesis de factores de virulencia, como ramnolípidos, movilidad, producción de sideróforos o ácido cianhídrico (HCN), entre otros (Cody et al., 2009; Little et al., 2018; Okkotsu et al., 2013; Whitchurch et al., 1996). Sin embargo, AlgR también es capaz de activar la transcripción de *algD* para la producción de alginato, de manera independiente a su fosforilación (Ma et al., 1998). En la actualidad, no está claro si en *P. aeruginosa* AlgR necesita ser fosforilado por FimS para la activación transcripcional de *mucR* (Kong et al., 2015). *A. vinelandii* no posee un ortólogo de FimS (Núñez et al., 1999), por lo que es posible que una histidina-cinasa o un donante de fosfato diferente regule a AlgR, o que AlgR active la transcripción de *mucR* en un estado no fosforilado.

No está claro qué tipo de señales son responsables del aumento de la acumulación de c-di-GMP durante el enquistamiento. Aunque *A. vinelandii* es una bacteria aeróbica estricta, durante el enquistamiento se enfrenta a cambios significativos en la actividad respiratoria acompañados de una reducción de la tasa de consumo de oxígeno y la supresión de la actividad NADH deshidrogenasa (Sadoff, 1975). Es probable que esta bacteria regule su metabolismo, incluyendo la cantidad de alginato y sus propiedades físicas, en respuesta al estado redox y/o la disponibilidad de oxígeno. MucR contiene tres dominios MHYT, que son dominios de señalización que presumiblemente unen gases diatómicos como NO, CO₂ u O₂. En *P. aeruginosa* se ha propuesto que el NO actúa como una molécula de señalización detectada por los dominios MHYT de MucR regulando la actividad de los dominios de salida GGDEF y EAL (Hay et al., 2009; Li et al., 2013). Estos resultados nos han permitido comprender un poco más acerca del proceso de diferenciación celular, al establecer el papel que tiene el c-di-GMP durante la formación de quistes resistentes a la desecación en *A. vinelandii*.

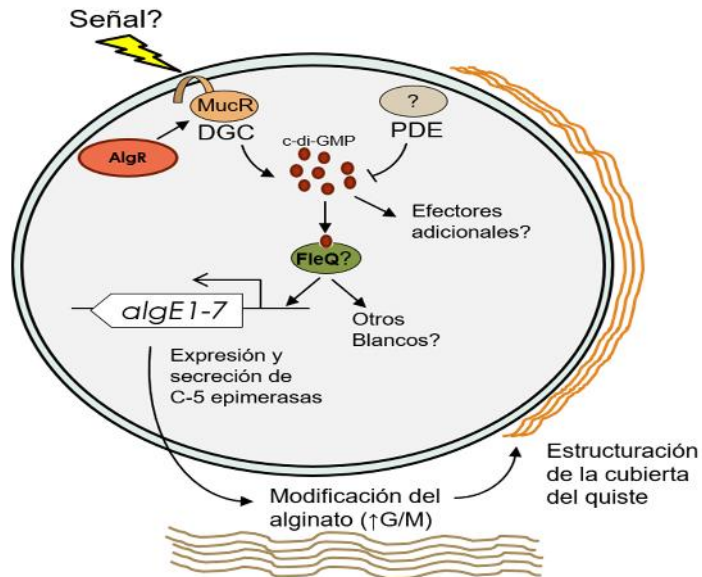


Figura 25. Modelo de regulación del enquistamiento en *A. vinelandii* por c-di-GMP. Se muestra el módulo de señalización encabezado por la DGC MucR, cuya actividad debe responder a una señal cuya naturaleza es aún desconocida. Las pozas generadas de c-di-GMP son necesarias para activar la expresión de las C5 epimerasas que como resultado final estructuran la cápsula que envuelve al quiste. No se descarta que esas pozas estén controlando otros procesos durante la diferenciación celular de *A. vinelandii*. El intermediario en dicha regulación se desconoce, pero un análisis *in silico* sugiere que pudiera ser el regulador transcripcional FleQ

1.11 Conclusiones

1. El c-di-GMP es esencial para el proceso de diferenciación celular en *A. vinelandii*, no solo en la producción de alginato, sino también en su modificación, proceso esencial en la estructuración de las cubiertas del quiste maduro.
2. MucR actúa como una DGC tanto en condiciones de crecimiento vegetativo como en condiciones de enquistamiento.
3. En condiciones vegetativas, MucR interviene en la formación de biopelículas y en la movilidad tipo nado.
3. MucR es una DGC esencial para el proceso de enquistamiento al regular positivamente la expresión de las C-5 MEs epimerasas AlgE1-6.
4. La expresión de *mucR* es regulada directa y positivamente por el regulador de respuesta AlgR.

1.12 Artículo



December 2020
Volume 202
Number 24
Published Twice Monthly



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

JB

Journal of Bacteriology



Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*

Iliana C. Martínez-Ortiz,^a Carlos L. Ahumada-Manuel,^a Brian Y. Hsueh,^b Josefina Guzmán,^a Soledad Moreno,^a Miguel Cocotl-Yañez,^c Christopher M. Waters,^b David Zamorano-Sánchez,^d 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

^cDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ABSTRACT The genus *Azotobacter*, belonging to the *Pseudomonadaceae* family, is characterized by the formation of cysts, which are metabolically dormant cells produced under adverse conditions and able to resist desiccation. Although this developmental process has served as a model for the study of cell differentiation in Gram-negative bacteria, the molecular basis of its regulation is still poorly understood. Here, we report that the ubiquitous second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) is critical for the formation of cysts in *Azotobacter vinelandii*. Upon encystment induction, the levels of c-di-GMP increased, reaching a peak within the first 6 h. In the absence of the diguanylate cyclase MucR, however, the levels of this second messenger remained low throughout the developmental process. *A. vinelandii* cysts are surrounded by two alginate layers with variable proportions of guluronic residues, which are introduced into the final alginate chain by extracellular mannuronan C-5 epimerases of the AlgE1 to AlgE7 family. Unlike in *Pseudomonas aeruginosa*, MucR was not required for alginate polymerization in *A. vinelandii*. Conversely, MucR was necessary for the expression of extracellular alginate C-5 epimerases; therefore, the MucR-deficient strain produced cyst-like structures devoid of the alginate capsule and unable to resist desiccation. Expression of *mucR* was partially dependent on the response regulator AlgR, which binds to two sites in the *mucR* promoter, enhancing *mucR* transcription. Together, these results indicate that the developmental process of *A. vinelandii* is controlled through a signaling module that involves activation by the response regulator AlgR and c-di-GMP accumulation that depends on MucR.

IMPORTANCE *A. vinelandii* has served as an experimental model for the study of the differentiation processes to form metabolically dormant cells in Gram-negative bacteria. This work identifies c-di-GMP as a critical regulator for the production of alginates with specific contents of guluronic residues that are able to structure the rigid laminated layers of the cyst envelope. Although allosteric activation of the alginate polymerase complex Alg8-Alg44 by c-di-GMP has long been recognized, our results show a previously unidentified role during the polymer modification step, controlling the expression of extracellular alginate epimerases. Our results also highlight the importance of c-di-GMP in the control of the physical properties of alginate, which ultimately determine the desiccation resistance of the differentiated cell.

KEYWORDS *Azotobacter vinelandii*, c-di-GMP, encystment, alginate, MucR, mannuronan C-5 epimerases, cyst capsule

Citation 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>.

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.00134-20>.

Received 12 March 2020

Cellular differentiation in bacteria is a highly coordinated process involving major metabolic, biochemical, and morphological changes leading to the formation of specialized cells, including spores or cysts, that are able to resist unfavorable conditions.

The molecular mechanisms sustaining this process rely on complex and hierarchical signal transduction pathways that ultimately affect gene expression. In both cyst- and spore-forming bacteria, the role of nucleotide-based second messengers such as cyclic dimeric GMP (c-di-GMP), cGMP, and cyclic dimeric AMP (c-di-AMP) have been described as crucial for successful cell development (1–4).

c-di-GMP is a nearly universal second messenger in bacteria. It is synthesized from two GTP molecules by diguanylate cyclases (DGCs) characterized by the presence of a GGDEF domain (the active site or A-site). Some DGCs also contain an allosteric inhibitory c-di-GMP binding site (I-site); hence, they are negatively regulated by their enzymatic product. c-di-GMP degradation is mediated by specific phosphodiesterases (PDEs) containing either EAL or HD-GYP domains (2, 5). In many cases, DGCs and PDEs harbor N-terminal sensory domains that regulate their activities in response to specific signals (6). c-di-GMP coordinates many cellular processes, including motility, biofilm formation, cell cycle progression, and cell development (2).

The genus *Azotobacter* belongs to the *Pseudomonadaceae* family and is characterized by the ability of its members to form cysts, which are differentiated cells that are able to resist desiccation, and *Azotobacter vinelandii* has served as a model for the study of this process (7, 8). During vegetative growth, *A. vinelandii* is motile because of peritrichous flagella and has a strictly aerobic type of metabolism (9). This bacterium produces two polymers, the exopolysaccharide alginate and the intracellular polyester poly- γ -hydroxybutyrate (PHB). Cyst formation can be synchronously induced in the presence of *n*-butanol or γ -hydroxybutyrate and is completed within 3 to 5 days (7). Mature cysts comprise a central body in which granules of PHB accumulate in the cytoplasm. These cells are surrounded by two rigid alginate layers (the exine and intine), which are essential for desiccation resistance. During encystment, bacteria lose the flagella, nitrogen fixation and aerobic respiration are inhibited, phospholipids are replaced by alkyl-resorcinols, and the carbohydrate metabolism is switched to a lipid type of metabolism (7). We recently reported the proteome of the *A. vinelandii* cyst and showed that the nature of the differentially produced proteins correlated with changes previously described to occur during differentiation. For instance, production of proteins responsible for flagellum assembly or motility were suppressed in the cyst, whereas the production of enzymes for the glyoxylate shunt, the synthesis of alkyl-resorcinols, or the production and modification of alginate increased with respect to the vegetative cell (10). The nature of the regulation of this developmental process is still poorly understood and most likely occurs at multiple levels.

A major component of the capsule layers of the cyst is the polysaccharide alginate, a linear copolymer composed of residues of α -D-mannuronic acid (M) and its C-5 epimer

α -L-guluronic acid (G) (8). Bacterial alginates are produced by two genera, *Azotobacter* and *Pseudomonas*. The biochemistry and genetics for the biosynthesis of this polymer are very well conserved between *Pseudomonas aeruginosa* and *A. vinelandii*. All of the biosynthetic genes, except for *algC*, are clustered in the chromosome, with the first gene being *algD* (11, 12). This gene cluster (*algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*) encodes proteins necessary for the generation of the alginate monomer, for alginate polymerization, for the periplasmic transfer of the polymer, and for modification and export through the outer membrane. The process of polymerization and cytoplasmic membrane transfer is conducted by Alg8 and Alg44 proteins. The activity of the inner membrane synthase protein Alg8 is posttranslationally regulated by Alg44 (also called the copolymerase), an inner membrane receptor that binds c-di-GMP (11, 13). c-di-GMP binding to the PilZ domain of Alg44 is essential for alginate polymerization in *P. aeruginosa* (13, 14).

In *A. vinelandii*, the secreted alginate is originally made as poly-mannuronan but is further modified by a family of extracellular enzymes, the Ca²⁺-dependent mannuronan C-5 epimerases (AlgE1 to AlgE7) (15). These enzymes are sequence homologous

proteins with molecular masses ranging from 57 to 191 kDa and consisting of two different modules, A and R. The R modules contain Ca²⁺-binding motifs and are necessary for full activity, while the A modules catalyze epimerization, introducing different distributions of G residues in the alginate substrate, including G blocks of various lengths (15). A higher G content confers a greater gelling capacity to the polymer. The exine, the outermost layer of the differentiated *A. vinelandii* cell, is characteristically rich in GG block sequences; therefore, the alginate AlgE C-5 epimerases are essential for cyst formation. Importantly, AlgE1, AlgE2 and/or AlgE5, AlgE4, and AlgE6 associated with the cyst were detected (16). AlgE1 to AlgE7 are secreted by a type I secretion system composed of proteins EexD, EexE, and EexF. In the absence of this secretion system or AlgE proteins, the alginate is produced almost as a mannuronan polymer and the differentiated cells lack the alginate coat and do not survive drought conditions (16, 17).

Regulation by c-di-GMP of the Alg8-Alg44 alginate polymerase activity in *P. aeruginosa* depends on the presence of the DGC MucR (18). In *P. aeruginosa*, expression of *mucR* and the alginate biosynthetic operon (*algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*) is directly regulated by the response regulator AlgR, which binds CCGTTGGTC motif elements in the promoter region of these genes (19, 20). Thus, by affecting the expression of *mucR* and *algD*, AlgR can control alginate production by indirectly affecting Alg44 activity and promoting the production of the alginate biosynthetic proteins (19, 20). In contrast, AlgR of *A. vinelandii* is dispensable for alginate production, because a reduction of only

50% was observed in an *algR*-deficient strain (21). Inactivation of *algR* in *A. vinelandii* impairs the proper organization of the alginate cyst coat, and the resulting cells are unable to resist desiccation (21). It is unclear, however, if the phenotypes associated with the absence of AlgR in *A. vinelandii* involve the same genetic interactions as observed in *P. aeruginosa*.

In this work, we analyzed the involvement of c-di-GMP in the encystment process of *A. vinelandii*. We found that c-di-GMP accumulates during the formation of cysts, and this accumulation was found to be MucR dependent. Although MucR was not required for alginate synthesis, it was necessary for alginate modification, as expression of mannuronan C-5 epimerases was reduced in the *mucR* mutant. As a consequence, the *mucR* mutant was unable to produce cysts resistant to desiccation. Together, our

RESULTS

A c-di-GMP signaling module involving MucR regulates cyst formation in *A. vinelandii*. Alginate is an essential component of the cyst envelope. Since in *P. aeruginosa* alginate is regulated by a c-di-GMP signaling module that relies on the DGC MucR, we explored whether cyst formation in *A. vinelandii* involves changes in c-di-GMP accumulation. To this end, we quantified the abundance of this second messenger at different time points under encysting-inducing conditions. c-di-GMP accumulation showed a 4-fold increase at 6 h, compared to uninduced conditions. After this point, c-di-GMP levels decreased over time (Fig. 1). To determine whether MucR (Avin_49140 [GenBank accession no. [ACO81013](#)], also referred to as AVIN_RS22475) was responsible for the c-di-GMP accumulation profile observed during cyst formation, we quantified c-di-GMP levels in a *mucR* strain. In the *mucR* strain, c-di-GMP levels decreased under cyst-inducing conditions, relative to vegetative conditions (time zero) and were lower along the developmental process, compared to the wild-type (WT) strain (Fig. 1). These results strongly suggest that MucR is part of a specific c-di-GMP signaling module that operates during cyst formation in *A. vinelandii*. It is worth pointing out that, under uninduced conditions (time zero, vegetative growth), the levels of c-di-GMP in the *mucR* strain were higher than those in the WT strain, which could be related to the presence of a PDE activity, as has been reported for MucR in *P. aeruginosa* (22).

To further explore the role of c-di-GMP and MucR during the developmental process of *A. vinelandii*, the *mucR* mutant was subjected to the desiccation resistance test, 74
December 2020 Volume 202 Issue 24 e00135-20

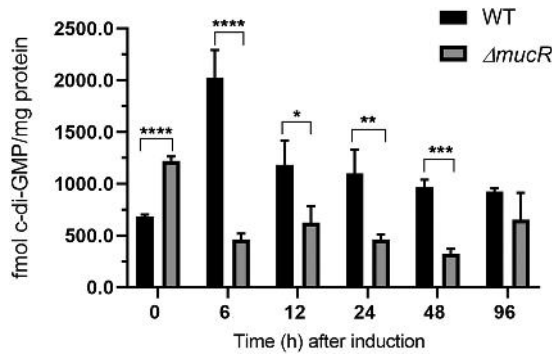


FIG 1 MucR contributes to the c-di-GMP pool under encysting-inducing conditions. c-di-GMP was quantified in the WT strain and in the *mucR* mutant during encystment induction. Vegetative cells were harvested after 48 h of growth in Burk's-sucrose medium (0 h), washed three times to remove traces of sucrose, and transferred to Burk's-butanol medium for the indicated time. The bars for 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* 0.0001; ****, *P* 0.00001.

which reflects the ability of the encystment-induced cells to form mature cysts. As shown in Fig. 2A, the *mucR* mutant showed a 50-fold reduced ability to form cysts able to resist a 5-day desiccation period, compared to the WT strain, whereas desiccation resistance was restored in a *mucR* derivative strain complemented with a WT copy of *mucR*.

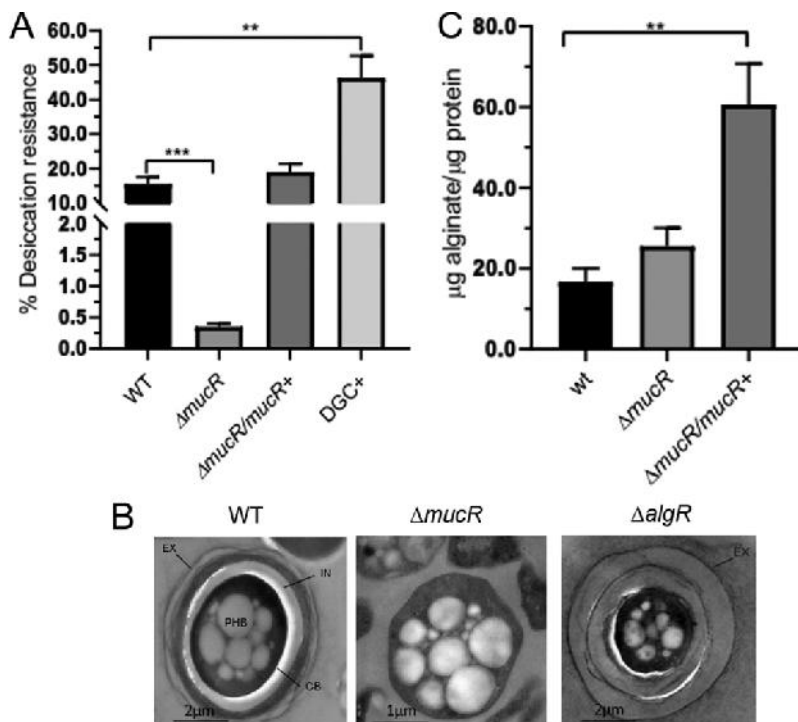


FIG 2 MucR is necessary for the formation of mature cysts resistant to desiccation but not for the production of alginate. (A) Mature cyst formation assay, based on the percentage of cells resistant to a 5-day period of desiccation. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, *P* 0.01; ***, *P* 0.0001. (B) Electron micrographs of *A. vinelandii* cysts after a 5-day period of differentiation. The cells were cultivated on plates of Burk's-butanol medium for encystment induction. In the WT strain, the central body (CB) and the PHB granules are indicated, as is the cyst capsule, which is composed of two laminated alginate layers, the exine (EX) and the intine (IN). (C) Alginate quantification in *A. vinelandii* cells grown on plates of Burk's-butanol medium after 48 h of encystment induction.

Electron microscopy visualization confirmed that, indeed, mature cyst formation was impaired in the *mucR* strain. In contrast to the cysts formed by the WT strain, the cyst-like structures derived from the *mucR* strain did not assemble the exine and intine layers and had central bodies lacking any structured capsular material (Fig. 2B). This phenotype is more remarkable than that observed for the *algR* mutant, for which an incipient exine layer is formed (21) (Fig. 2B).

The positive role of c-di-GMP during encystment was confirmed using a strain with artificially increased levels of this second messenger. In a companion work (23), we constructed and characterized an *A. vinelandii* WT derivative strain overproducing the *A. vinelandii* DGC AvGReg and demonstrated that this strain has elevated levels of c-di-GMP. This strain was subjected to the desiccation resistance test and, as anticipated, the proportion of mature cysts was 43%, almost 3-fold higher than the value for the WT strain (Fig. 2A, DGC). Together, these results implied that cyst formation in *A. vinelandii* is regulated by a c-di-GMP signaling module that involves MucR.

MucR is not required for alginate synthesis. In *P. aeruginosa*, c-di-GMP and MucR are required for alginate production. Based on this precedent, we hypothesized that the effect of c-di-GMP and MucR on cyst development in *A. vinelandii* was a result of deficient alginate production. To begin to address this question, we analyzed the ability of the *mucR* strain to produce alginate under encysting conditions. We observed that the WT strain and the *mucR* strain accumulated similar amounts of alginate, indicating that in *A. vinelandii* activation of the Alg8-Alg44 copolymerase complex by c-di-GMP does not rely on MucR (Fig. 2C). On the other hand, complementation of *mucR* with a WT copy of the *mucR* gene integrated into the chromosome resulted in increased production of alginate, compared to the WT and *mucR* strains. The latter result suggests that MucR can promote alginate production, perhaps in a nonspecific manner, by increasing the levels of the c-di-GMP pool.

MucR is critical for the production of mannuronan C-5 epimerases. Since MucR did not appear to be critical for alginate production in *A. vinelandii*, we next asked what the molecular basis for the cyst formation phenotype of the *mucR* strain could be. Mannuronan C-5 epimerases of the AlgE1 to AlgE7 family are critical for the extracellular modification of the alginate chain that is essential for structuring the alginate cyst coats (17), and the *mucR* mutant made cyst-like structures lacking these alginate coats. Thus, we hypothesized that MucR regulates the expression of *algE* genes and/or the production of the AlgE mannuronan C-5 epimerases.

As a first approach, the effect of MucR on the transcription of *algE* genes was evaluated by quantitative PCR (qPCR). During the developmental process, AlgE1, AlgE2, AlgE4, AlgE5, and AlgE6 epimerases are the ones associated to the cyst (24). In a previous work, a single pair of oligonucleotides aligning within a highly conserved region of *algE1* to *algE6* genes and allowing the simultaneous quantification of their transcript abundance was designed. Therefore, qPCR assays were conducted using this pair of oligonucleotides and total RNA from the WT and *mucR* strains. We observed transcription of the *algE1* to *algE6* genes in the WT strain but not in the *mucR* strain, strongly suggesting that MucR is required for the expression of these genes (Fig. 3A). The complemented *mucR* strain, which we previously showed produces more alginate, had a 6-fold increase in *algE1* to *algE6* expression, compared to the WT strain (Fig. 3A).

We next evaluated whether the mannuronan C-5 epimerases were present in the central body of differentiated cells in both the WT and *mucR* strains. Five bands detected in Western blots corresponding to AlgE epimerases were detected on the cyst surface of the WT strain, and only one of those was present in the *mucR* strain (Fig.

3B). Previous studies demonstrated that the AlgE1 to AlgE7 proteins have abnormal migration rates, which prevent their proper identification based only on the expected molecular mass (24, 25). Therefore, the identity of the AlgE1 to AlgE7 epimerases under the control of MucR remains unknown. We included the AlgE epimerase profile of an

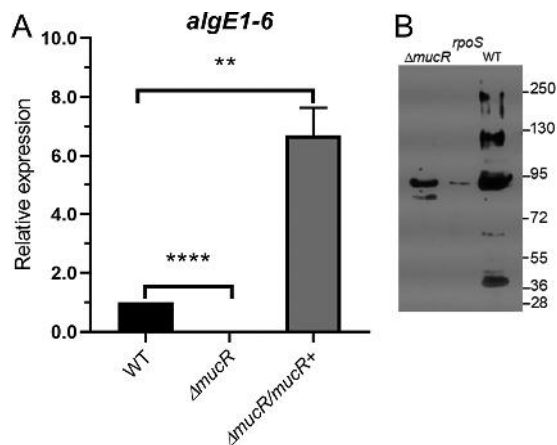


FIG 3 MucR is necessary for the production of extracellular C-5 epimerases. (A) Determination of the relative abundance of *algE1* to *algE6* mRNA by qPCR in encystment-induced cells at 48 h. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.00001$. (B) Detection of AlgE C-5 epimerases associated with the central body of *A. vinelandii* cells undergoing differentiation in Burk's-butanol medium for 5 days. Anti-AlgE4 antibody was used as the primary antibody.

RpoS-deficient mutant as a control for a previously described positive regulator of *algE* expression (26).

The mRNA levels of the *eexDEF* operon, encoding the AlgE1 to AlgE7 type I secretion system, did not change in the *mucR* strain, compared to the WT strain (0.95–0.16 and 1.0 relative unit, respectively). The *gyrA* mRNA levels were used as an internal control, allowing normalization of the qRT-PCR data. This result indicated that the absence of AlgE proteins over the cyst surface is not caused by a lack of expression of this secretion machinery.

Together, these data suggest that loss of MucR function results in the loss of expression of the genes coding for the mannuronan C-5 epimerases, likely accounting for the loss of the surface polysaccharide coat.

***mucR* is directly regulated by the response regulator AlgR in *A. vinelandii*.** To further explore the signaling module containing MucR in *A. vinelandii*, we investigated whether the *mucR* gene is subject to regulation by AlgR in this bacterium. To begin the characterization of the regulatory region of *mucR*, we first identified the transcription start sites. Two transcripts were identified, and two different transcription start sites were mapped to positions 114 and 157, relative to the ATG translation initiation site of *mucR* (Fig. 4A). We did not find any conserved 10 and 35 boxes in this region, which could be explained by the need for a transcriptional activator and/or alternative sigma factors (Fig. 4B).

The *mucR* transcripts could not be detected in a *algR* strain, suggesting that AlgR is a positive regulator of this gene (Fig. 4A). The positive effect of AlgR on *mucR* expression was further confirmed by qPCR assays. The level of *mucR* transcripts was diminished by 40% in the *algR* mutant, compared to the WT strain under vegetative growth conditions. The expression of *mucR* during encystment-inducing conditions was also under the control of AlgR (Fig. 5A). Based on the qPCR assays, it appears that expression of *mucR* does not exclusively rely on AlgR. It is possible that an AlgR-independent transcript was not resolved in our primer extension assays and thus will require further experimentation. We next investigated whether transcription of *mucR* was enhanced under encysting conditions. As shown in Fig. 5B, *mucR* mRNA levels increased 6-fold, relative to vegetative conditions. This result is somehow expected, considering that we previously reported that the accumulation of AlgR was 22 higher in the cyst, compared to vegetative cells (10).

To further elucidate the mechanism by which AlgR regulates *mucR* expression, we analyzed the interaction of this protein with the regulatory region of *mucR* (*PmucR*).

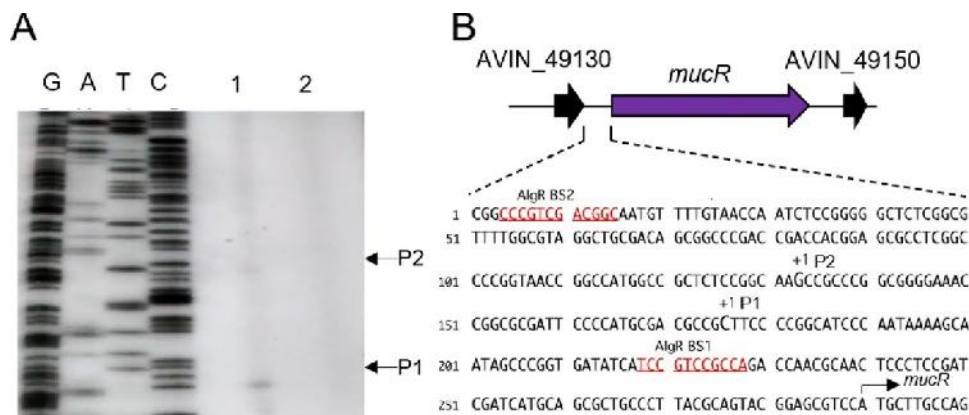


FIG 4 Identification of the transcription start sites of *mucR*. (A) Transcription start sites were identified by primer extension with total RNA extracted from the WT (lane 1) and *algR* (lane 2) strains grown in Burk's-sucrose medium for 48 h and a primer complementary to *mucR*. The cDNA obtained was resolved in a denaturing polyacrylamide gel, along with DNA sequence ladders generated by chemical sequencing of *mucR*. The transcription start sites (P1 and P2) are indicated. (B) Genomic context of the *mucR* gene. The *mucR* flanking genes encode hypothetical conserved proteins. In the lower panel, the location of the two *mucR* transcription start sites (P1 and P2) identified in panel A are indicated, along with putative AlgR binding sites (BS1 and BS2).

Two potential AlgR binding sites were found, resembling the previously identified AlgR binding sites in *P. aeruginosa* (19). The proximal site (BS1 [TCCGTCCGCC]) was located at position 61, whereas the distal site (BS2 [GCCGTGACG]) was located at position

274, relative to the *mucR* translation start codon (Fig. 4B and 6A). Binding of AlgR to a DNA fragment of 486 bp containing BS1 and BS2 was tested by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). A DNA fragment carrying the regulatory region of the Avin_05510 gene, encoding a β -ketoacyl synthase, was included as a negative control. AlgR specifically bound the *PmucR* DNA fragment at concentrations ranging from 0.52 to 1.4 μ M (Fig. 6B).

We next determined whether AlgR could bind the two recognition sites individually. AlgR was able to recognize the two sites separately at concentrations ranging from 0.5 to 1.4 μ M (Fig. 6C and D). However, less protein (0.87 μ M) was required to fully shift the BS2 site, compared to the amount required to fully shift BS1. It is worth noting that the EMSAs were performed using a nonradioactive method (27, 28); thus, the observed

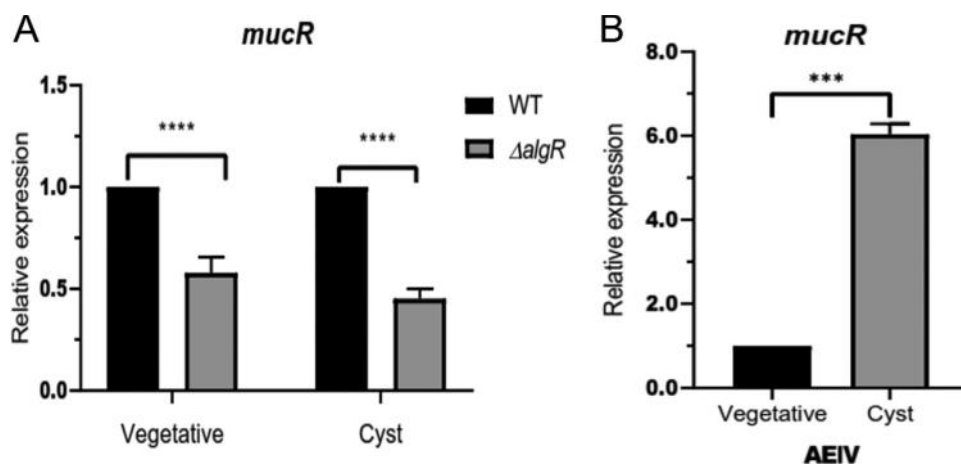


FIG 5 Transcriptional regulation of *mucR* assessed by qPCR analysis. (A) Effect of AlgR on *mucR* transcription. The *mucR* mRNA levels in the Δ *algR* strain were determined under vegetative (Burk's-sucrose medium for 48 h) or encysting (Burk's-butanol medium for 48 h) conditions and were compared to those in the WT strain. (B) mRNA levels of *mucR* under encysting conditions, relative to those under vegetative conditions. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$.

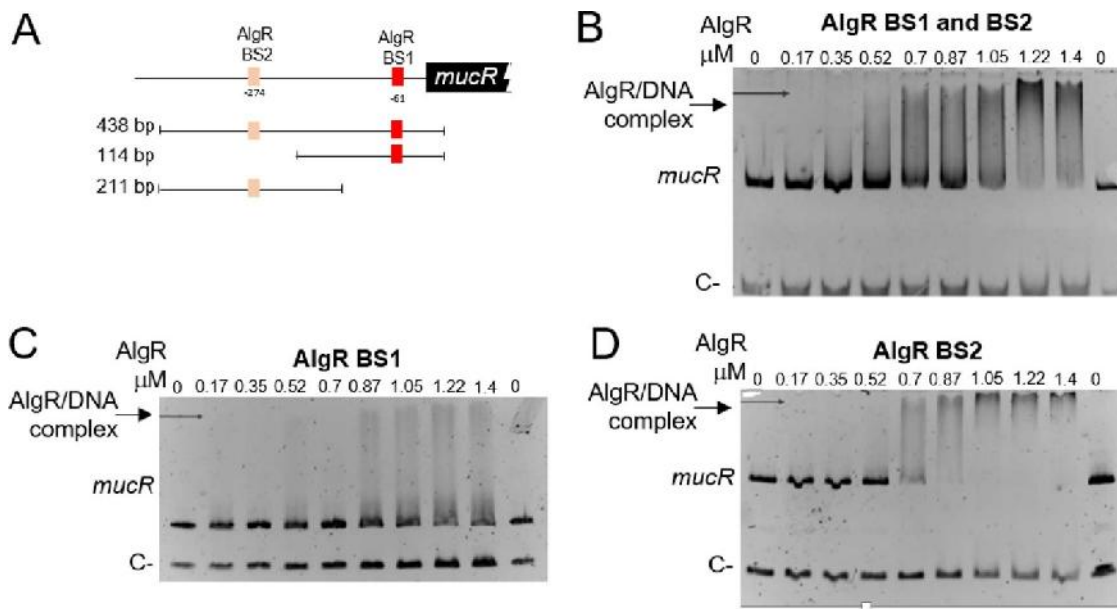


FIG 6 The response regulator AlgR binds directly to *PmucR*. (A) Schematic representation of the putative AlgR binding sites (BS1 and BS2) identified in *PmucR*. The DNA fragments used in panels B (438 bp), C (114 bp), and D (211 bp) are shown. (B, C, and D) EMSAs were performed in order to analyze the AlgR binding to a *PmucR* fragment carrying BS1 and BS2 (B), BS1 only (C), or BS2 only (D). The DNA fragments were incubated with increasing concentrations of AlgR. As a negative control, a fragment carrying the regulatory region of *Avin_05510* was included in each DNA binding reaction. The migration of the DNA fragments was visualized by staining with ethidium bromide.

amounts of AlgR needed to shift the *PmucR* DNA fragments are within the range of the technique (up to 1.5 μ M). Altogether, these results clearly confirmed the direct control of *mucR* by the response regulator AlgR.

DISCUSSION

c-di-GMP has been linked to the regulation of cell differentiation in a variety of bacterial models. In the deltaproteobacterium *Myxococcus xanthus*, a minimum threshold level of c-di-GMP is required for the formation of spore-filled fruiting bodies (1, 29). During this process, c-di-GMP gradually accumulates up to 20-fold after 48 h of nutrient limitation using the cytoplasmic DGC DmxB. The c-di-GMP receptor involved in this process is the transcriptional regulator EpsI/Nia24, which regulates the expression of an exopolysaccharide essential for fruiting body formation (1). In this work, we show that the developmental process of *A. vinelandii* is regulated through c-di-GMP signaling and relies on MucR. The absence of MucR reduced the concentration of this second messenger along the entire differentiation process and prevented the proper assembly of the alginate cyst layers.

We hypothesized that the relationship between c-di-GMP and encystment would be at the level of alginate production. This hypothesis was based on two observations. The first is that alginate polymerization is regulated through c-di-GMP in *P. aeruginosa* by the DGC MucR. The second one is that a putative PDE that we named MucG is involved in alginate production in *A. vinelandii*. In an accompanying work, we demonstrate that MucG is in fact a PDE that negatively regulates alginate production and its molecular mass (23). *A. vinelandii* also has an orthologue of MucR; therefore, we speculated that this other DGC could be important for alginate production, affecting cyst formation in this bacterium. We found that, in contrast to what is observed in *P. aeruginosa*, MucR was not essential for alginate polymerization in *A. vinelandii* but was necessary for the formation of the alginate coat characteristic of mature cysts. Since structuring of the alginate coat requires the activity of extracellular C-5 epimerases, we evaluated whether the abundance and/or localization of these proteins was altered in the absence of MucR, and we found that MucR regulates the expression of *algE1* to *algE6*

genes and the presence of AlgE epimerases in cysts. In order for MucR to regulate transcription of the *algE1* to *algE6* genes, it must alter the activity of a c-di-GMP receptor that can act as a transcriptional regulator. No examples in *A. vinelandii* have been described; however, *P. aeruginosa* has one of the best characterized c-di-GMP receptors of this class, the flagellar gene master regulator FleQ (30, 31). This receptor activates flagellar gene expression at low c-di-GMP levels and switches to activating *pel* genes, which are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide Pel, when c-di-GMP levels increase (32). *A. vinelandii* has a FleQ orthologue that shares 77% identity with FleQ from *P. aeruginosa*. We identified putative FleQ binding sites in the regulatory region of *algE1* to *algE7* in *A. vinelandii* by using Virtual Footprint software (33); therefore, our working hypothesis is that MucR regulates the expression of these genes by modulating the activity of FleQ. Work is under way to investigate the genetic relationship between *mucR* and *fleQ* in terms of the regulation of both the alginate coat structuring and the expression of the *algE1* to *algE7* genes.

Together, our results let us propose that MucR helps to produce alginates with a content of G residues that, in the presence of Ca²⁺ ions, favors the formation of the rigid gel structure characteristic of the exine and intine layers of the *A. vinelandii* cysts. The cyst envelope is a complex structure in which alginate is one of the major components; however, it also contains other carbohydrates, proteins, alkyl-resorcinol lipids, and DNA. The formation of this structure is a gradual process of discontinuous layering around the cell that mainly occurs during the first 30 to 48 h of differentiation (8); therefore, the outermost layer, the exine, is the first to be formed, followed by the intine. Alginate C-5 epimerases, such as AlgE1, AlgE2, AlgE6, and AlgE4, which generate a variety of alginate structures present in the cyst coat, are released from the encysting cells primarily between 12 h and 36 h after induction (24). Our results show that MucR affects the overall pool of c-di-GMP, even in early stages of differentiation. In fact, the c-di-GMP peak observed within the first 6 h in the WT strain does not occur in the *mucR* mutant, suggesting that such an increase in the pool of this second messenger is a prerequisite for the successful formation of a mature cyst. Whether MucR is required only for the modification of the alginate chains contained in the exine and intine layers of the cyst or is also involved in the synthesis of other components of the cyst coat is not known. Given the important physiological and morphological changes occurring during early stages of differentiation, such as the loss of the flagella or the arrest of DNA synthesis, we cannot rule out the existence of additional processes under the control of the c-di-GMP signaling regulatory cascade that depends on MucR.

In the companion paper (23), we demonstrate that in *A. vinelandii* c-di-GMP favors the synthesis of longer alginate chains in an AvGReg- and MucG-dependent manner. AvGReg is a globin-coupled sensor DGC that is necessary for alginate production, while MucG is a PDE that negatively regulates this biosynthetic pathway; these proteins appear to act at a different stage of the biosynthesis of alginate, compared to MucR. Thus, it appears that MucG, together with the DGC AvGReg, affects alginate polymerization, perhaps by targeting Alg44. On the other hand, MucR, together with a currently unidentified c-di-GMP receptor (perhaps FleQ), affects alginate modification by regulating the transcription of genes encoding C-5 mannuronan epimerases. This regulatory scheme suggests that not only the amount but also the physical properties of this polymer are tightly controlled in response to environmental conditions.

In *P. aeruginosa*, AlgR is a key transcriptional regulator required for the expression of multiple virulence factors, including alginate (34–37), and modulation of the pool of c-di-GMP via *mucR* transcription (19). Although AlgR was not essential for alginate production in *A. vinelandii*, it was required for structuring the alginate cyst coats (21). In the present study, we found that, as in *P. aeruginosa*, *mucR* in *A. vinelandii* is directly regulated by AlgR. AlgR abundance was 22-fold higher in soluble protein extracts from cysts, compared to vegetative cells (10), which explains the higher levels of *mucR* transcription during cell differentiation, favoring accumulation of c-di-GMP and cell cycle progression. In *P. aeruginosa*, phosphorylation of AlgR by the histidine kinase FimS (also named AlgZ) leads to the differential regulation of target genes. In its

TABLE 1 Strains and plasmid used in the present study

Strain or plasmid	Genotype and relevant characteristics ^a	Source or reference
Bacterial strains		
<i>A. vinelandii</i>	WT strain	43
AEIV (also named E strain)	AEIV derivative carrying a <i>mucR</i> ::Gm mutation	This work
ICM01	ICM01 derivative complemented with WT copy of <i>mucR</i> integrated into its native locus in the chromosome; Gm ^r Km ^r	This work
CN100		
<i>Escherichia coli</i>	<i>supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA</i>	45
DH5	F <i>ompT hsdS_B(r_B m_B) gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
BL21(DE3)		
Plasmids		
pJET1.2/Blunt vector	PCR cloning vector; Ap ^r Source of the Gm ^r cassette	Thermo Fisher
pBSL141	Source of the Km ^r cassette	Scientific
pBSL128	Expression vector	49
pET-21a()	Cloning vector; Km ^r	49
pBBR1MCS-2		
pJG99	pJET1.2/Blunt vector derivative carrying a 2.6-kb fragment containing the <i>mucR</i> gene pJG99 derivative carrying a <i>mucR</i> ::Gm mutation; used to construct the mutant ICM01 pJG99 derivative carrying a Km ^r cassette as a selection marker at a <i>ScaI</i> site of the	Novagen
pJG100		
pJG99-Km	multiple cloning site; used to construct the complemented strain ICM09 pJET1.2/Blunt vector derivative carrying a <i>algR</i> ::Km construction; linearized with <i>ScaI</i> and used to construct the mutant CN100	50
pJG98	pET-21a(+) vector derivative expressing the AlgR protein carrying a His ₆ tag at the	This work
pETR-3P	N terminus	This work

^aGm, gentamicin; Gm^r, gentamicin resistance; Ap^r, ampicillin resistance; Km, kanamycin; Km^r, kanamycin resistance.

phosphorylated form, AlgR is required for the transcriptional activation/modulation of genes necessary for the synthesis of virulence factors, such as rhamnolipids, twitching motility-related proteins, siderophores, or hydrogen cyanide-producing proteins, among others (34, 36, 38–40). However, AlgR is also capable of activating *algD* transcription, for the production of alginate, in a phosphorylation-independent manner (37). At present, it is unclear whether AlgR needs to be phosphorylated by FimS for the transcriptional activation of *mucR* in *P. aeruginosa* (19). FimS is not present in *A. vinelandii* (21); therefore, it is possible either that a different histidine kinase or phospho-donor regulates AlgR or that AlgR activates *mucR* transcription in a nonphosphorylated state.

It is unclear what type of signals are responsible for the increased accumulation of c-di-GMP during encystment. Although *A. vinelandii* is a strict aerobic bacterium, during encystment it faces significant changes in respiratory activity, accompanied by a reduction in oxygen uptake rates and suppression of the activity of the NADH dehydrogenase (8). Thus, it is likely that this bacterium regulates its metabolism, including the amount of alginate and its physical properties, in response to the redox state and/or oxygen availability. MucR contains three MHYT domains, which are signaling domains predicted to bind diatomic gases such as NO, CO, and O₂. In *P. aeruginosa*, it has been proposed that NO acts as a signaling molecule detected by the MHYT domains of MucR, regulating the activity of the output GGDEF and EAL domains (18, 22, 41). The MHYT domains have also been implicated in detecting the redox state by means of a coordinated Cu²⁺ ion (42).

We are beginning to recognize another level of complexity in the regulation of alginate biosynthesis in *A. vinelandii*, where multiple c-di-GMP signaling modules

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this work are listed in Tables 1 and 2. The *A. vinelandii* WT strain AEIV (also named E strain) (43) was used in this work. Vegetative *A. vinelandii* growth was conducted in Burk's nitrogen-free salts medium supplemented

TABLE 2 Sequences of the primers used in this study

Name	Nucleotide sequence (5- to 3-)	Template	Used for
mucR-F	CAATGCAGACCAGTCGCGCTC	Chromosomal DNA WT	Plasmid pJG99
mucR-R	CTTCGGCTGCTGTCTGCCAG	Chromosomal DNA WT	Plasmid pJG98
algR km-1	CTGTTTCAGGCCGTCGATG		
algR km-2	CACTCACCAGACGGGCTG	pBRIMMCS-2	
algR km-3	CAGCCGTCTGGTGAGTGACCTGGGATGAATGTCAGCTAC	Chromosomal DNA WT	
algR km-4	TGCGATGGATGCGCACGAGAAGCGCGGCTGGAATCG		
algR km-5	CGTGCGCATCCATCGCA		
algR km-6		NA ^a	qPCR, internal control
gyrAfw	GTCTCCAGCTCCTTGAC		
gyrArev	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	NA	qPCR, <i>algE1</i> to <i>algE6</i>
FwRT- <i>algE1-6</i>	CACGAGCAGACCATCAACCTG ATGTTGAAGCCGTGGCGGTCGTTG	NA	qPCR, <i>eexD</i>
RvRT- <i>algE1-6</i>	GGTGACTATGGGCTCTCTGG CTGCCCCGGTATACATCTCG	NA	Primer extension, <i>mucR</i>
FwRT- <i>eexD</i>	GTGTAGGAGGCGGAGGATGG		
RvRT- <i>eexD</i>	CAAGGATCCAATGTTCTGATCGTC	Chromosomal DNA WT	pETR-3P
mucR-Rv-primer	CACAAGCTTGGAGGCCAGTTGATT	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS1 and BS2 sites
algRBamP	GAATCCCATCACGCCGACTG		
algRHindP	GACGCTCCGTA CTGCGTAAG GCTTCCCCGGCATCCCAATA	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS1 site
mucR-F-2-sites	GACGCTCCGTA CTGCGTAAG	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS2 site
mucR-R-2-sites	GAATCCCATCACGCCGACTG CTACGCCAAAACGCCGAGAG		

^aNA, not applicable.

with 20 g liter⁻¹ of sucrose (Burk's-sucrose medium). The composition of the culture medium has been described elsewhere (44). Cultures were grown in 250-ml Erlenmeyer flasks with 50 ml of filling volume at 200 rpm and 30. For encystment induction, vegetative *A. vinelandii* cells (grown for 48 h in 50 ml of Burk's-sucrose medium) were collected by centrifugation and washed three times with Burk's buffer (the same mineral medium without a carbon source) to remove traces of sucrose. The cells were resuspended in 1 ml of Burk's buffer, and 200 μ l of this suspension was plated over the surface of solid Burk's medium supplemented with 0.2% (vol/vol) *n*-butanol (Burk's-butanol medium), which induces cell differentiation. The plates were incubated for 5 days to allow completion of the differentiation process. In order to have a synchronous suspension of encystment-induced cells, when indicated the vegetative cells were resuspended in the same volume of fresh liquid Burk's-butanol medium and incubated for the indicated times.

Escherichia coli DH5 cells were grown in lysogeny broth (LB) at 37°C (45, 46). When needed, the final antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli* were as follows: gentamicin, 1 and 10 μ g ml⁻¹; kanamycin (Km), 1 and 10 μ g ml⁻¹; ampicillin, not used and 200 μ g ml⁻¹, respectively.

DNA manipulation. All DNA manipulations were performed following standard protocols (47). PCR amplifications were performed using the high-fidelity Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs. Plasmid isolation and DNA purification were performed using kits from Thermo Fisher Scientific, following the instructions of the manufacturer. All constructs were sequenced to verify sequence integrity and fidelity. DNA sequencing was conducted by the Sanger method, using fluorescent dideoxy terminators and a cycle sequencing method in a 3130xl analyzer (Applied Biosystems).

Construction of *A. vinelandii* mutants. Construction of the plasmids used to build *A. vinelandii* mutants is described in Table 1. *A. vinelandii* transformation was conducted using the natural competent state induced under iron-limited growth conditions, as described previously (44, 48). Competent *A. vinelandii* cells were transformed with plasmid DNA carrying the desired mutation and previously linearized to ensure double reciprocal recombination and allelic exchange. Transformants were selected on Burk's-sucrose medium amended with the corresponding antibiotic. Due to the polyploid nature of *A. vinelandii*, gene inactivation in all of the chromosomal copies was confirmed by PCR analysis.

For the construction of a MucR-deficient mutant, a fragment of 2.6 kb carrying the *mucR* gene was PCR amplified using the primer pair mucR-F/mucR-R and was ligated to plasmid pJET 1.2/Blunt (Thermo Fisher Scientific). The resulting vector, named pJG99, was excised with BssHI enzyme, deleting an internal *mucR* fragment of 1.5 kb that was replaced by a gentamicin resistance cassette released with the same enzyme from vector pBSL141 (49). The plasmid generated was named pJG100 and carried the resistance cassette ligated in the same orientation as that of *mucR* transcription. This plasmid, previously linearized with the ScaI endonuclease, was used to transform AEIV cells, generating strain ICM01 (*mucR*). To genetically complement mutant ICM01, a WT copy of the *mucR* gene was introduced into the *mucR* chromosomal locus. To this end, a HindIII fragment carrying a Km resistance (Km^r) cassette from plasmid pBSL128 (49) was ligated to the polylinker of plasmid pJG99 (*mucR*), generating pGJ99-Km. This plasmid, which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was introduced into ICM01 by transformation and Km^r single recombinants were selected; one such transformant, named ICM09, was chosen for further characterization.

A strain carrying a deletion of the entire *algR* gene, *algR::Km*, was constructed and was named CN100. A *algR::Km* mutation was constructed by recombinant PCR. The three following PCR products were assembled in the order of appearance by overlapping PCR: (i) 458 bp upstream of *algR* (from 439 to 26 with respect to the ATG start codon); (ii) 1,112 bp corresponding to the Km^r cassette from plasmid pBBRIMCS-2 (50); and (iii) 536 bp downstream of *algR* (from 598 to 1117 with respect to the ATG start codon). The Km^r cassette was inserted in the same orientation as *algR* transcription. The *algR::Km* construction was cloned into pJET1.2/Blunt vector, giving rise to plasmid pJG98. Finally, this was linearized with endonuclease ScaI and transformed into WT competent cells, generating mutant CN100.

Nucleotide isolation and c-di-GMP quantification. c-di-GMP quantification was conducted following a protocol previously described (51). For nucleotide extraction, 47 ml of cell culture induced for encystment was centrifuged at 5,752 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 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 μl of ultraperformance liquid chromatography (UPLC)-grade water, and 10 μl 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 in 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 (52).

Resistance to desiccation. Resistance to desiccation was assessed as reported previously (53). In brief, cells of *A. vinelandii* grown for 48 h in 50 ml of liquid Burk's-sucrose medium were collected by centrifugation and washed three times with Burk's buffer to remove traces of sucrose. After this, the cells were resuspended in 1 ml of Burk's buffer; 200 μl of this suspension was spread on the surface of Burk's-butanol solid medium and incubated for 5 days at 30°C. After this time, the encystment-induced cells were collected and resuspended in 10 mM MgSO₄. Approximately 10⁶ CFU was applied to Millipore membranes of 0.2- μm pore size; when dried, they were incubated for 5 days at 30°C, with only mature cysts being able to survive. After this time, the membranes were soaked for 5 h in Burk's buffer and the cells were released by vortex mixing. Viable cell counts before and after desiccation were determined in serial dilutions.

Electron microscopy assays. Visualization of *A. vinelandii* cysts was performed by following a previously reported protocol with some modifications (54). Cells for which encystment had been induced for 5 days in liquid Burk's-butanol medium were collected and washed three times with phosphate buffer (pH 7.2) at 4°C. They were then washed with 0.16 M sodium cacodylate buffer and fixed with a paraformaldehyde (4%)-glutaraldehyde (2%) mixture for 1 h at room temperature. After the cells were washed again with 0.16 M sodium cacodylate, they were fixed with 2% osmium tetroxide for 2 h at 4°C. Following fixation, cell suspensions were washed and then dehydrated by passage through a graded ethanol series. After exposure to propylene oxide, samples were embedded in an Epon 812 resin, which was allowed to polymerize for 24 h at 65°C. Ultrathin sections were cut, incubated with uranyl acetate, washed with distilled water, treated with lead citrate, washed again, and observed with a Zeiss transmission electron microscope (model Libra 120, at 80 kV).

Analytical methods. To determine specific alginate production, the strains were cultivated under encysting conditions on plates of Burk's-butanol medium for 48 h. The presence of 0.2% *n*-butanol as the sole carbon source triggers cellular differentiation in about 95% of the population (7, 8), allowing synchronization of the cellular response during encystment. After 48 h, the cells were harvested and washed twice with 10 ml of Burk's buffer to extract the alginate. After centrifugation, the cells were used to determine the total protein content by the Lowry method (52). The alginate from the supernatants was precipitated with 3 volumes of cold 2-propanol, washed twice with 70% ethanol, dried, and resuspended in 1 ml of distilled water. Alginate was quantitated by the spectrophotometric determination of uronic acids with carbazole (55).

Quantitative real-time reverse transcription. Total RNA was extracted as described (56) from cells grown in liquid Burk's-sucrose or Burk's-butanol medium for 48 h. Genomic DNA contamination was removed with DNase I (Thermo Fisher Scientific). Details of cDNA synthesis and reverse transcription-qPCR amplification conditions have been reported elsewhere (44). The relative levels of *algE1* to *algE6* and *eexD* were determined by comparing the quantity of each mRNA under the tested conditions, using *gyrA* (Avin_15810) mRNA as an internal control. The sequences of the primer pairs used are listed in Table

2. These primers were designed using the Primer3 program (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>) (optimal length of 20 bases and melting temperature of 60°C). Validation of each primer set was conducted by verifying specific single-product amplification by melting curve analyses. Three biological replicates (independent cultures) were performed, with three technical replicates for each one. Similar results were obtained for the transcription of all measured genes in the repetitions. A no-template control reaction was included for each gene. The quantification technique used to analyze the data generated was the 2^{-CT} method reported previously (57).

Detection of AlgE-type C-5 epimerases. Western blot assays to detect AlgE epimerases were performed as described previously, using anti-AlgE4 antibodies (24), with some modifications. Cells of *A. vinelandii* were cultivated on plates of Burk's-butanol medium for 5 days; after this time, the proteins associated with the cell were extracted. To this end, cells were collected, washed with 1 ml of 50 mM Tris (pH 7.8), centrifuged for 10 min, resuspended in 0.5 ml of 50 mM Tris-3 mM Na₂EDTA, and shaken at 250 rpm for 35 min. The cell suspension was centrifuged, and the supernatant contained the epimerases associated with the surface of the central body. The proteins were blotted as described (24).

Primer extension assay. The transcription start site of *mucR* was mapped by primer extension analysis under vegetative conditions. Total RNA was extracted from the *A. vinelandii* WT strain and from mutant CN100 (*algR::Km*) grown in Burk's-sucrose medium for 48 h. The oligonucleotide used as a primer for the extension was end labeled with [32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase (Roche). Primer extension was performed at 42°C with avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Roche), as indicated by the supplier. The extended cDNA product was analyzed by electrophoresis on a denaturing

6% urea-polyacrylamide gel, in parallel with a DNA sequence ladder produced with the same primer by using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit (USB). Plasmid pJG99, carrying the regulatory region of *mucR*, was used as a DNA template. We were unable to identify the *mucR* transcription start sites under encysting conditions using this technique, which could be related to the limited amount of total RNA extracted from cells undergoing differentiation.

Expression and purification of AlgR-His protein. The AlgR protein was purified as a recombinant protein with a 6 His tag at the C terminus (AlgR-His). To produce this recombinant protein, the *algR* gene was cloned in the expression vector pET-21a(+) (Novagen), generating pETR-3P. The *E. coli* BL21 strain was transformed with plasmid pETR-3P, and overproduction of AlgR-His was induced by addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to cells grown to mid-log phase (A_{600} 0.5). After 4 h of induction at 37°C, cells were collected by centrifugation and disrupted by sonication in lysis buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Lysed cells were centrifuged for 30 min at 20,000 g at 4°C, and the supernatant was loaded onto an equilibrated column containing the nickel resin Ni-nitrilotriacetic acid-agarose. The column was washed twice with washing buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole), and the protein was eluted with elution buffer I (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 500 mM imidazole). The protein was concentrated by using Microcon YM-10 centrifugal filters (Amicon) and stored in elution buffer II (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). Protein concentrations were determined by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard (52). SDS-PAGE of the purified protein revealed the expected molecular mass of approximately 28 kDa.

Electrophoretic mobility shift assays. EMSAs were conducted using a nonradioactive method reported previously (27, 28). Regions of various lengths upstream of *mucR* were amplified by PCR, as follows: (i) 438 bp containing the entire regulatory region; (ii) 211 bp containing only AlgR binding site 2; and (iii) 114 bp containing only AlgR binding site 1. Binding reactions were performed by mixing an individual PCR product (100 ng) with increasing concentrations of purified AlgR-His protein in binding buffer (10 mM Tris [pH 8], 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 10 g/ml bovine serum albumin), in a total volume of 20 μ l. These reaction mixtures were incubated at room temperature for 20 min and then analyzed by electrophoresis on 6% nondenaturing acrylamide gels run with 0.5 Tris-borate-EDTA buffer. The migration of the DNA fragments was visualized by staining with ethidium bromide and excitation under UV illumination.

Statistical analysis. GraphPad Prism (version 6.0) software (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for statistical analyses. Statistical significance was assessed using two-tailed, unpaired Student's *t* tests, and *P* values of ≤ 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Ainsworth and M. Tabche for computational and technical support and G. Zavala for the acquisition of electron microscopy images. We thank H. Ertesvåg for kindly providing the anti-AlgE4 antibodies and G. Soberón-Chávez and G. O'Toole for critical reading of the manuscript.

I.C.M.-O. is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and has received a CONACyT fellowship (no. 596217). This work was supported by project PAPIIT IN204818 (UNAM) to C.N. and NIH grants GM109259 and AI144395 to C.M.W.

REFERENCES

- Skotnicka D, Smaldone GT, Petters T, Trampari E, Liang J, Kaefer V, Malone JG, Singer M, Søgaard-Andersen L. 2016. A minimal threshold of c-di-GMP is essential for fruiting body formation and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *PLoS Genet* 12:e1006080. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006080>.
- Jenal U, Reinders A, Lori C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* 15:271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.
- Marden JN, Dong Q, Roychowdhury S, Berleman JE, Bauer CE. 2011. Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development: cGMP control of encystment. *Mol Microbiol* 79:600–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07513.x>.
- Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. 2011. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* 12:594–601. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.77>.
- Romling 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>.
- Galperin MY. 2010. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13:150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- 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>.
- Sadoff HL. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* 39:516–539. <https://doi.org/10.1128/MMBR.39.4.516-539.1975>.



December 2020
Volume 202
Number 24
Published Twice Monthly




AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

JB

Journal of Bacteriology



Cyclic di-GMP-Mediated Regulation of Extracellular Mannuronan C-5 Epimerases Is Essential for Cyst Formation in *Azotobacter vinelandii*

Iliana C. Martínez-Ortiz,^a Carlos L. Ahumada-Manuel,^a Brian Y. Hsueh,^b Josefina Guzmán,^a Soledad Moreno,^a Miguel Cocotl-Yañez,^c Christopher M. Waters,^b David Zamorano-Sánchez,^d 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

^cDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

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

ABSTRACT The genus *Azotobacter*, belonging to the *Pseudomonadaceae* family, is characterized by the formation of cysts, which are metabolically dormant cells produced under adverse conditions and able to resist desiccation. Although this developmental process has served as a model for the study of cell differentiation in Gram-negative bacteria, the molecular basis of its regulation is still poorly understood. Here, we report that the ubiquitous second messenger cyclic dimeric GMP (*c*-di-GMP) is critical for the formation of cysts in *Azotobacter vinelandii*. Upon encystment induction, the levels of *c*-di-GMP increased, reaching a peak within the first 6 h. In the absence of the diguanylate cyclase MucR, however, the levels of this second messenger remained low throughout the developmental process. *A. vinelandii* cysts are surrounded by two alginate layers with variable proportions of guluronic residues, which are introduced into the final alginate chain by extracellular mannuronic C-5 epimerases of the AlgE1 to AlgE7 family. Unlike in *Pseudomonas aeruginosa*, MucR was not required for alginate polymerization in *A. vinelandii*. Conversely, MucR was necessary for the expression of extracellular alginate C-5 epimerases; therefore, the MucR-deficient strain produced cyst-like structures devoid of the alginate capsule and unable to resist desiccation. Expression of *mucR* was partially dependent on the response regulator AlgR, which binds to two sites in the *mucR* promoter, enhancing *mucR* transcription. Together, these results indicate that the developmental process of *A. vinelandii* is controlled through a signaling module that involves activation by the response regulator AlgR and *c*-di-GMP accumulation that depends on MucR.

IMPORTANCE *A. vinelandii* has served as an experimental model for the study of the differentiation processes to form metabolically dormant cells in Gram-negative bacteria. This work identifies *c*-di-GMP as a critical regulator for the production of alginates with specific contents of guluronic residues that are able to structure the rigid laminated layers of the cyst envelope. Although allosteric activation of the alginate polymerase complex Alg8-Alg44 by *c*-di-GMP has long been recognized, our results show a previously unidentified role during the polymer modification step, controlling the expression of extracellular alginate epimerases. Our results also highlight the importance of *c*-di-GMP in the control of the physical properties of alginate, which ultimately determine the desiccation resistance of the differentiated cell.

KEYWORDS *Azotobacter vinelandii*, *c*-di-GMP, encystment, alginate, MucR, mannuronan C-5 epimerases, cyst capsule

Citation 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>.

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.00134-20>.

Received 12 March 2020

Accepted 23 September 2020

Accepted manuscript posted online 28 September 2020

Published 19 November 2020

Cellular differentiation in bacteria is a highly coordinated process involving major metabolic, biochemical, and morphological changes leading to the formation of specialized cells, including spores or cysts, that are able to resist unfavorable conditions. The molecular mechanisms sustaining this process rely on complex and hierarchical signal transduction pathways that ultimately affect gene expression. In both cyst- and spore-forming bacteria, the role of nucleotide-based second messengers such as cyclic dimeric GMP (c-di-GMP), cGMP, and cyclic dimeric AMP (c-di-AMP) have been described as crucial for successful cell development (1–4).

c-di-GMP is a nearly universal second messenger in bacteria. It is synthesized from two GTP molecules by diguanylate cyclases (DGCs) characterized by the presence of a GGDEF domain (the active site or A-site). Some DGCs also contain an allosteric inhibitory c-di-GMP binding site (I-site); hence, they are negatively regulated by their enzymatic product. c-di-GMP degradation is mediated by specific phosphodiesterases (PDEs) containing either EAL or HD-GYP domains (2, 5). In many cases, DGCs and PDEs harbor N-terminal sensory domains that regulate their activities in response to specific signals (6). c-di-GMP coordinates many cellular processes, including motility, biofilm formation, cell cycle progression, and cell development (2).

The genus *Azotobacter* belongs to the *Pseudomonadaceae* family and is characterized by the ability of its members to form cysts, which are differentiated cells that are able to resist desiccation, and *Azotobacter vinelandii* has served as a model for the study of this process (7, 8). During vegetative growth, *A. vinelandii* is motile because of peritrichous flagella and has a strictly aerobic type of metabolism (9). This bacterium produces two polymers, the exopolysaccharide alginate and the intracellular polyester poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Cyst formation can be synchronously induced in the presence of *n*-butanol or β -hydroxybutyrate and is completed within 3 to 5 days (7). Mature cysts comprise a central body in which granules of PHB accumulate in the cytoplasm. These cells are surrounded by two rigid alginate layers (the exine and intine), which are essential for desiccation resistance. During encystment, bacteria lose the flagella, nitrogen fixation and aerobic respiration are inhibited, phospholipids are replaced by alkyl-resorcinols, and the carbohydrate metabolism is switched to a lipid type of metabolism (7). We recently reported the proteome of the *A. vinelandii* cyst and showed that the nature of the differentially produced proteins correlated with changes previously described to occur during differentiation. For instance, production of proteins responsible for flagellum assembly or motility were suppressed in the cyst, whereas the production of enzymes for the glyoxylate shunt, the synthesis of alkyl-resorcinols, or the production and modification of alginate increased with respect to the vegetative cell (10). The nature of the regulation of this developmental process is still poorly understood and most likely occurs at multiple levels.

A major component of the capsule layers of the cyst is the polysaccharide alginate, a linear copolymer composed of residues of β -D-mannuronic acid (M) and its C-5 epimer α -L-guluronic acid (G) (8). Bacterial alginates are produced by two genera, *Azotobacter* and *Pseudomonas*. The biochemistry and genetics for the biosynthesis of this polymer are very well conserved between *Pseudomonas aeruginosa* and *A. vinelandii*. All of the biosynthetic genes, except for *algC*, are clustered in the chromosome, with the first gene being *algD* (11, 12). This gene cluster (*algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*) encodes proteins necessary for the generation of the alginate monomer, for alginate polymerization, for the periplasmic transfer of the polymer, and for modification and export through the outer membrane. The process of polymerization and cytoplasmic membrane transfer is conducted by Alg8 and Alg44 proteins. The activity of the inner membrane synthase protein Alg8 is posttranslationally regulated by Alg44 (also called the copolymerase), an inner membrane receptor that binds c-di-GMP (11, 13). c-di-GMP binding to the PilZ domain of Alg44 is essential for alginate polymerization in *P. aeruginosa* (13, 14).

In *A. vinelandii*, the secreted alginate is originally made as poly-mannuronan but is further modified by a family of extracellular enzymes, the Ca²⁺-dependent mannuronan C-5 epimerases (AlgE1 to AlgE7) (15). These enzymes are sequence homologous

proteins with molecular masses ranging from 57 to 191 kDa and consisting of two different modules, A and R. The R modules contain Ca²⁺-binding motifs and are necessary for full activity, while the A modules catalyze epimerization, introducing different distributions of G residues in the alginate substrate, including G blocks of various lengths (15). A higher G content confers a greater gelling capacity to the polymer. The exine, the outermost layer of the differentiated *A. vinelandii* cell, is characteristically rich in GG block sequences; therefore, the alginate AlgE C-5 epimerases are essential for cyst formation. Importantly, AlgE1, AlgE2 and/or AlgE5, AlgE4, and AlgE6 associated with the cyst were detected (16). AlgE1 to AlgE7 are secreted by a type I secretion system composed of proteins EexD, EexE, and EexF. In the absence of this secretion system or AlgE proteins, the alginate is produced almost as a mannuronan polymer and the differentiated cells lack the alginate coat and do not survive drought conditions (16, 17).

Regulation by c-di-GMP of the Alg8-Alg44 alginate polymerase activity in *P. aeruginosa* depends on the presence of the DGC MucR (18). In *P. aeruginosa*, expression of *mucR* and the alginate biosynthetic operon (*algD-8-44-K-J-G-X-L-I-V-F-A*) is directly regulated by the response regulator AlgR, which binds CCGTTGGTC motif elements in the promoter region of these genes (19, 20). Thus, by affecting the expression of *mucR* and *algD*, AlgR can control alginate production by indirectly affecting Alg44 activity and promoting the production of the alginate biosynthetic proteins (19, 20). In contrast, AlgR of *A. vinelandii* is dispensable for alginate production, because a reduction of only 50% was observed in an *algR*-deficient strain (21). Inactivation of *algR* in *A. vinelandii* impairs the proper organization of the alginate cyst coat, and the resulting cells are unable to resist desiccation (21). It is unclear, however, if the phenotypes associated with the absence of AlgR in *A. vinelandii* involve the same genetic interactions as observed in *P. aeruginosa*.

In this work, we analyzed the involvement of c-di-GMP in the encystment process of *A. vinelandii*. We found that c-di-GMP accumulates during the formation of cysts, and this accumulation was found to be MucR dependent. Although MucR was not required for alginate synthesis, it was necessary for alginate modification, as expression of mannuronan C-5 epimerases was reduced in the Δ *mucR* mutant. As a consequence, the Δ *mucR* mutant was unable to produce cysts resistant to desiccation. Together, our results show that alginate production and alginate modification can be separately regulated by c-di-GMP in *A. vinelandii*.

RESULTS

A c-di-GMP signaling module involving MucR regulates cyst formation in *A. vinelandii*. Alginate is an essential component of the cyst envelope. Since in *P. aeruginosa* alginate is regulated by a c-di-GMP signaling module that relies on the DGC MucR, we explored whether cyst formation in *A. vinelandii* involves changes in c-di-GMP accumulation. To this end, we quantified the abundance of this second messenger at different time points under encysting-inducing conditions. c-di-GMP accumulation showed an ~4-fold increase at 6 h, compared to uninduced conditions. After this point, c-di-GMP levels decreased over time (Fig. 1). To determine whether MucR (Avin_49140 [GenBank accession no. [ACO81013](#)], also referred to as AVIN_RS22475) was responsible for the c-di-GMP accumulation profile observed during cyst formation, we quantified c-di-GMP levels in a Δ *mucR* strain. In the Δ *mucR* strain, c-di-GMP levels decreased under cyst-inducing conditions, relative to vegetative conditions (time zero) and were lower along the developmental process, compared to the wild-type (WT) strain (Fig. 1). These results strongly suggest that MucR is part of a specific c-di-GMP signaling module that operates during cyst formation in *A. vinelandii*. It is worth pointing out that, under uninduced conditions (time zero, vegetative growth), the levels of c-di-GMP in the Δ *mucR* strain were higher than those in the WT strain, which could be related to the presence of a PDE activity, as has been reported for MucR in *P. aeruginosa* (22).

To further explore the role of c-di-GMP and MucR during the developmental process of *A. vinelandii*, the Δ *mucR* mutant was subjected to the desiccation resistance test,

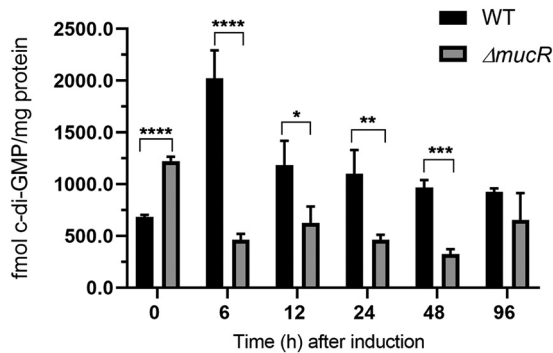


FIG 1 MucR contributes to the c-di-GMP pool under encystment-inducing conditions. c-di-GMP was quantified in the WT strain and in the $\Delta mucR$ mutant during encystment induction. Vegetative cells were harvested after 48 h of growth in Burk's-sucrose medium (0 h), washed three times to remove traces of sucrose, and transferred to Burk's-butanol medium for the indicated time. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$.

which reflects the ability of the encystment-induced cells to form mature cysts. As shown in Fig. 2A, the $\Delta mucR$ mutant showed a 50-fold reduced ability to form cysts able to resist a 5-day desiccation period, compared to the WT strain, whereas desiccation resistance was restored in a $\Delta mucR$ derivative strain complemented with a WT copy of *mucR*.

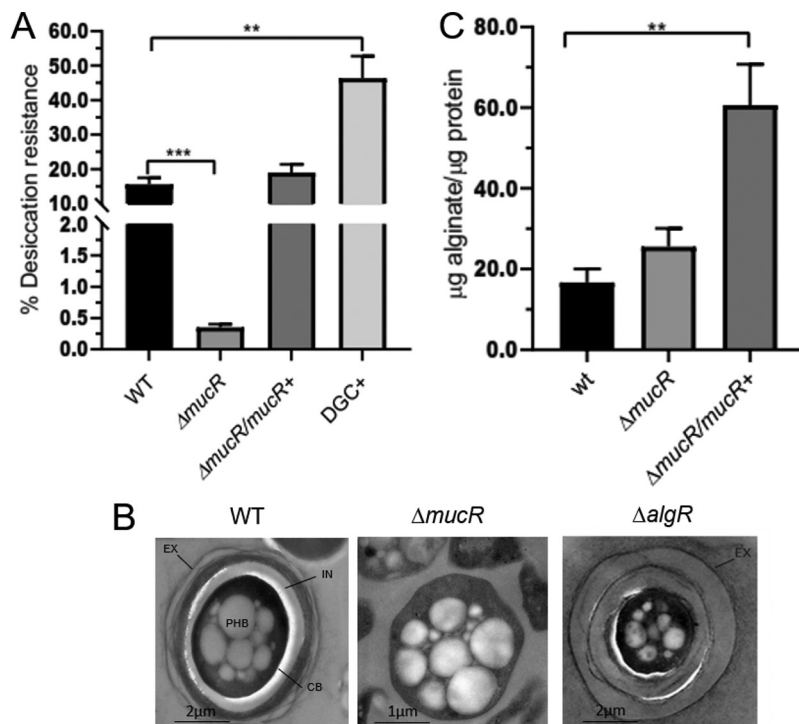


FIG 2 MucR is necessary for the formation of mature cysts resistant to desiccation but not for the production of alginate. (A) Mature cyst formation assay, based on the percentage of cells resistant to a 5-day period of desiccation. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$. (B) Electron micrographs of *A. vinelandii* cysts after a 5-day period of differentiation. The cells were cultivated on plates of Burk's-butanol medium for encystment induction. In the WT strain, the central body (CB) and the PHB granules are indicated, as is the cyst capsule, which is composed of two laminated alginate layers, the exine (EX) and the intine (IN). (C) Alginate quantification in *A. vinelandii* cells grown on plates of Burk's-butanol medium after 48 h of encystment induction.

Electron microscopy visualization confirmed that, indeed, mature cyst formation was impaired in the $\Delta mucR$ strain. In contrast to the cysts formed by the WT strain, the cyst-like structures derived from the $\Delta mucR$ strain did not assemble the exine and intine layers and had central bodies lacking any structured capsular material (Fig. 2B). This phenotype is more remarkable than that observed for the $\Delta algR$ mutant, for which an incipient exine layer is formed (21) (Fig. 2B).

The positive role of c-di-GMP during encystment was confirmed using a strain with artificially increased levels of this second messenger. In a companion work (23), we constructed and characterized an *A. vinelandii* WT derivative strain overproducing the *A. vinelandii* DGC AvGReg and demonstrated that this strain has elevated levels of c-di-GMP. This strain was subjected to the desiccation resistance test and, as anticipated, the proportion of mature cysts was 43%, almost 3-fold higher than the value for the WT strain (Fig. 2A, DGC+). Together, these results implied that cyst formation in *A. vinelandii* is regulated by a c-di-GMP signaling module that involves MucR.

MucR is not required for alginate synthesis. In *P. aeruginosa*, c-di-GMP and MucR are required for alginate production. Based on this precedent, we hypothesized that the effect of c-di-GMP and MucR on cyst development in *A. vinelandii* was a result of deficient alginate production. To begin to address this question, we analyzed the ability of the $\Delta mucR$ strain to produce alginate under encysting conditions. We observed that the WT strain and the $\Delta mucR$ strain accumulated similar amounts of alginate, indicating that in *A. vinelandii* activation of the Alg8-Alg44 copolymerase complex by c-di-GMP does not rely on MucR (Fig. 2C). On the other hand, complementation of $\Delta mucR$ with a WT copy of the *mucR* gene integrated into the chromosome resulted in increased production of alginate, compared to the WT and $\Delta mucR$ strains. The latter result suggests that MucR can promote alginate production, perhaps in a nonspecific manner, by increasing the levels of the c-di-GMP pool.

MucR is critical for the production of mannuronan C-5 epimerases. Since MucR did not appear to be critical for alginate production in *A. vinelandii*, we next asked what the molecular basis for the cyst formation phenotype of the $\Delta mucR$ strain could be. Mannuronan C-5 epimerases of the AlgE1 to AlgE7 family are critical for the extracellular modification of the alginate chain that is essential for structuring the alginate cyst coats (17), and the $\Delta mucR$ mutant made cyst-like structures lacking these alginate coats. Thus, we hypothesized that MucR regulates the expression of *algE* genes and/or the production of the AlgE mannuronan C-5 epimerases.

As a first approach, the effect of MucR on the transcription of *algE* genes was evaluated by quantitative PCR (qPCR). During the developmental process, AlgE1, AlgE2, AlgE4, AlgE5, and AlgE6 epimerases are the ones associated to the cyst (24). In a previous work, a single pair of oligonucleotides aligning within a highly conserved region of *algE1* to *algE6* genes and allowing the simultaneous quantification of their transcript abundance was designed. Therefore, qPCR assays were conducted using this pair of oligonucleotides and total RNA from the WT and $\Delta mucR$ strains. We observed transcription of the *algE1* to *algE6* genes in the WT strain but not in the $\Delta mucR$ strain, strongly suggesting that MucR is required for the expression of these genes (Fig. 3A). The complemented $\Delta mucR$ strain, which we previously showed produces more alginate, had a 6-fold increase in *algE1* to *algE6* expression, compared to the WT strain (Fig. 3A).

We next evaluated whether the mannuronan C-5 epimerases were present in the central body of differentiated cells in both the WT and $\Delta mucR$ strains. Five bands detected in Western blots corresponding to AlgE epimerases were detected on the cyst surface of the WT strain, and only one of those was present in the $\Delta mucR$ strain (Fig. 3B). Previous studies demonstrated that the AlgE1 to AlgE7 proteins have abnormal migration rates, which prevent their proper identification based only on the expected molecular mass (24, 25). Therefore, the identity of the AlgE1 to AlgE7 epimerases under the control of MucR remains unknown. We included the AlgE epimerase profile of an

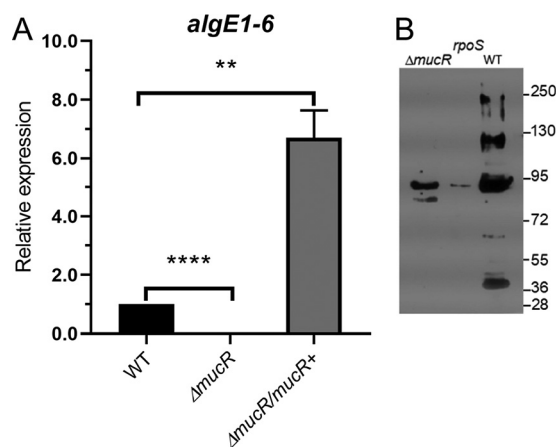


FIG 3 MucR is necessary for the production of extracellular C-5 epimerases. (A) Determination of the relative abundance of *algE1* to *algE6* mRNA by qPCR in encystment-induced cells at 48 h. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.00001$. (B) Detection of AlgE C-5 epimerases associated with the central body of *A. vinelandii* cells undergoing differentiation in Burk's-butanol medium for 5 days. Anti-AlgE4 antibody was used as the primary antibody.

RpoS-deficient mutant as a control for a previously described positive regulator of *algE* expression (26).

The mRNA levels of the *eexDEF* operon, encoding the AlgE1 to AlgE7 type I secretion system, did not change in the $\Delta mucR$ strain, compared to the WT strain (0.95 ± 0.16 and 1.0 relative unit, respectively). The *gyrA* mRNA levels were used as an internal control, allowing normalization of the qRT-PCR data. This result indicated that the absence of AlgE proteins over the cyst surface is not caused by a lack of expression of this secretion machinery.

Together, these data suggest that loss of MucR function results in the loss of expression of the genes coding for the mannuronan C-5 epimerases, likely accounting for the loss of the surface polysaccharide coat.

***mucR* is directly regulated by the response regulator AlgR in *A. vinelandii*.** To further explore the signaling module containing MucR in *A. vinelandii*, we investigated whether the *mucR* gene is subject to regulation by AlgR in this bacterium. To begin the characterization of the regulatory region of *mucR*, we first identified the transcription start sites. Two transcripts were identified, and two different transcription start sites were mapped to positions -114 and -157 , relative to the ATG translation initiation site of *mucR* (Fig. 4A). We did not find any conserved -10 and -35 boxes in this region, which could be explained by the need for a transcriptional activator and/or alternative sigma factors (Fig. 4B).

The *mucR* transcripts could not be detected in a $\Delta algR$ strain, suggesting that AlgR is a positive regulator of this gene (Fig. 4A). The positive effect of AlgR on *mucR* expression was further confirmed by qPCR assays. The level of *mucR* transcripts was diminished by 40% in the $\Delta algR$ mutant, compared to the WT strain under vegetative growth conditions. The expression of *mucR* during encystment-inducing conditions was also under the control of AlgR (Fig. 5A). Based on the qPCR assays, it appears that expression of *mucR* does not exclusively rely on AlgR. It is possible that an AlgR-independent transcript was not resolved in our primer extension assays and thus will require further experimentation. We next investigated whether transcription of *mucR* was enhanced under encysting conditions. As shown in Fig. 5B, *mucR* mRNA levels increased 6-fold, relative to vegetative conditions. This result is somehow expected, considering that we previously reported that the accumulation of AlgR was 22 higher in the cyst, compared to vegetative cells (10).

To further elucidate the mechanism by which AlgR regulates *mucR* expression, we analyzed the interaction of this protein with the regulatory region of *mucR* (*PmucR*).

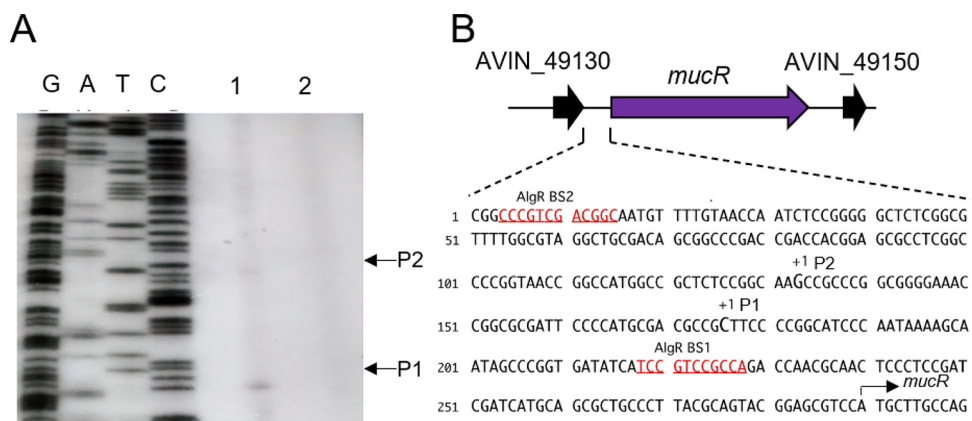


FIG 4 Identification of the transcription start sites of *mucR*. (A) Transcription start sites were identified by primer extension with total RNA extracted from the WT (lane 1) and $\Delta algR$ (lane 2) strains grown in Burk's-sucrose medium for 48 h and a primer complementary to *mucR*. The cDNA obtained was resolved in a denaturing polyacrylamide gel, along with DNA sequence ladders generated by chemical sequencing of *mucR*. The transcription start sites (P1 and P2) are indicated. (B) Genomic context of the *mucR* gene. The *mucR* flanking genes encode hypothetical conserved proteins. In the lower panel, the location of the two *mucR* transcription start sites (P1 and P2) identified in panel A are indicated, along with putative AlgR binding sites (BS1 and BS2).

Two potential AlgR binding sites were found, resembling the previously identified AlgR binding sites in *P. aeruginosa* (19). The proximal site (BS1 [TCCGTCCGCC]) was located at position -61 , whereas the distal site (BS2 [GCCGTCGACG]) was located at position -274 , relative to the *mucR* translation start codon (Fig. 4B and 6A). Binding of AlgR to a DNA fragment of 486 bp containing BS1 and BS2 was tested by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). A DNA fragment carrying the regulatory region of the *Avin_05510* gene, encoding a β -ketoacyl synthase, was included as a negative control. AlgR specifically bound the *PmucR* DNA fragment at concentrations ranging from 0.52 to 1.4 μ M (Fig. 6B).

We next determined whether AlgR could bind the two recognition sites individually. AlgR was able to recognize the two sites separately at concentrations ranging from 0.5 to 1.4 μ M (Fig. 6C and D). However, less protein (0.87 μ M) was required to fully shift the BS2 site, compared to the amount required to fully shift BS1. It is worth noting that the EMSAs were performed using a nonradioactive method (27, 28); thus, the observed

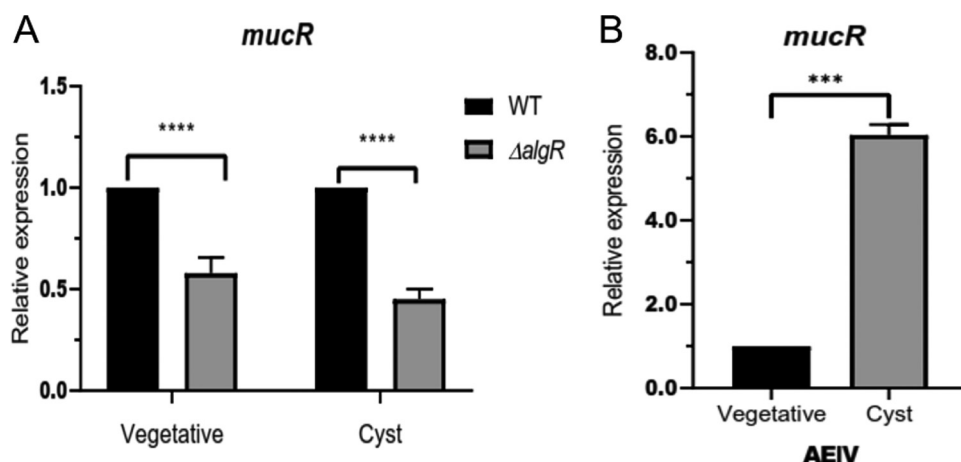


FIG 5 Transcriptional regulation of *mucR* assessed by qPCR analysis. (A) Effect of AlgR on *mucR* transcription. The *mucR* mRNA levels in the $\Delta algR$ strain were determined under vegetative (Burk's-sucrose medium for 48 h) or encysting (Burk's-butanol medium for 48 h) conditions and were compared to those in the WT strain. (B) mRNA levels of *mucR* under encysting conditions, relative to those under vegetative conditions. The bars for standard deviations from three independent experiments are shown. Significant differences were analyzed by *t* test. Statistical significance is indicated. ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$.

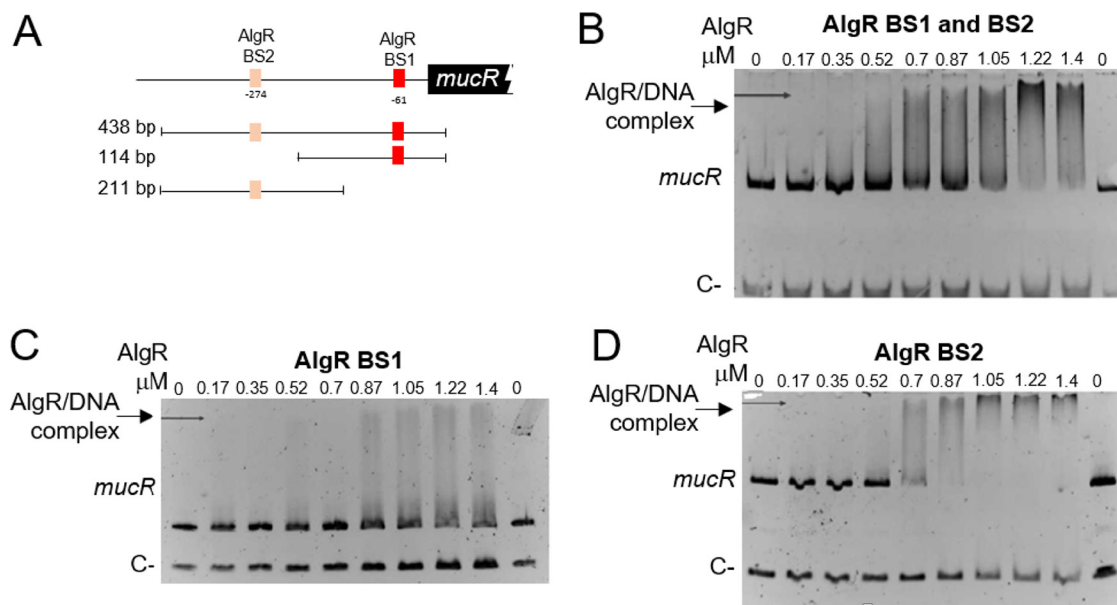


FIG 6 The response regulator AlgR binds directly to *PmucR*. (A) Schematic representation of the putative AlgR binding sites (BS1 and BS2) identified in *PmucR*. The DNA fragments used in panels B (438 bp), C (114 bp), and D (211 bp) are shown. (B, C, and D) EMSAs were performed in order to analyze the AlgR binding to a *PmucR* fragment carrying BS1 and BS2 (B), BS1 only (C), or BS2 only (D). The DNA fragments were incubated with increasing concentrations of AlgR. As a negative control, a fragment carrying the regulatory region of *Avin_05510* was included in each DNA binding reaction. The migration of the DNA fragments was visualized by staining with ethidium bromide.

amounts of AlgR needed to shift the *PmucR* DNA fragments are within the range of the technique (up to 1.5 μM). Altogether, these results clearly confirmed the direct control of *mucR* by the response regulator AlgR.

DISCUSSION

c-di-GMP has been linked to the regulation of cell differentiation in a variety of bacterial models. In the deltaproteobacterium *Myxococcus xanthus*, a minimum threshold level of c-di-GMP is required for the formation of spore-filled fruiting bodies (1, 29). During this process, c-di-GMP gradually accumulates up to 20-fold after 48 h of nutrient limitation using the cytoplasmic DGC DmxB. The c-di-GMP receptor involved in this process is the transcriptional regulator EpsI/Nla24, which regulates the expression of an exopolysaccharide essential for fruiting body formation (1). In this work, we show that the developmental process of *A. vinelandii* is regulated through c-di-GMP signaling and relies on MucR. The absence of MucR reduced the concentration of this second messenger along the entire differentiation process and prevented the proper assembly of the alginate cyst layers.

We hypothesized that the relationship between c-di-GMP and encystment would be at the level of alginate production. This hypothesis was based on two observations. The first is that alginate polymerization is regulated through c-di-GMP in *P. aeruginosa* by the DGC MucR. The second one is that a putative PDE that we named MucG is involved in alginate production in *A. vinelandii*. In an accompanying work, we demonstrate that MucG is in fact a PDE that negatively regulates alginate production and its molecular mass (23). *A. vinelandii* also has an orthologue of MucR; therefore, we speculated that this other DGC could be important for alginate production, affecting cyst formation in this bacterium. We found that, in contrast to what is observed in *P. aeruginosa*, MucR was not essential for alginate polymerization in *A. vinelandii* but was necessary for the formation of the alginate coat characteristic of mature cysts. Since structuring of the alginate coat requires the activity of extracellular C-5 epimerases, we evaluated whether the abundance and/or localization of these proteins was altered in the absence of MucR, and we found that MucR regulates the expression of *algE1* to *algE6*

genes and the presence of AlgE epimerases in cysts. In order for MucR to regulate transcription of the *algE1* to *algE6* genes, it must alter the activity of a c-di-GMP receptor that can act as a transcriptional regulator. No examples in *A. vinelandii* have been described; however, *P. aeruginosa* has one of the best characterized c-di-GMP receptors of this class, the flagellar gene master regulator FleQ (30, 31). This receptor activates flagellar gene expression at low c-di-GMP levels and switches to activating *pel* genes, which are involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide Pel, when c-di-GMP levels increase (32). *A. vinelandii* has a FleQ orthologue that shares 77% identity with FleQ from *P. aeruginosa*. We identified putative FleQ binding sites in the regulatory region of *algE1* to *algE7* in *A. vinelandii* by using Virtual Footprint software (33); therefore, our working hypothesis is that MucR regulates the expression of these genes by modulating the activity of FleQ. Work is under way to investigate the genetic relationship between *mucR* and *fleQ* in terms of the regulation of both the alginate coat structuring and the expression of the *algE1* to *algE7* genes.

Together, our results let us propose that MucR helps to produce alginates with a content of G residues that, in the presence of Ca²⁺ ions, favors the formation of the rigid gel structure characteristic of the exine and intine layers of the *A. vinelandii* cysts. The cyst envelope is a complex structure in which alginate is one of the major components; however, it also contains other carbohydrates, proteins, alkyl-resorcinol lipids, and DNA. The formation of this structure is a gradual process of discontinuous layering around the cell that mainly occurs during the first 30 to 48 h of differentiation (8); therefore, the outermost layer, the exine, is the first to be formed, followed by the intine. Alginate C-5 epimerases, such as AlgE1, AlgE2, AlgE6, and AlgE4, which generate a variety of alginate structures present in the cyst coat, are released from the encysting cells primarily between 12 h and 36 h after induction (24). Our results show that MucR affects the overall pool of c-di-GMP, even in early stages of differentiation. In fact, the c-di-GMP peak observed within the first 6 h in the WT strain does not occur in the Δ *mucR* mutant, suggesting that such an increase in the pool of this second messenger is a prerequisite for the successful formation of a mature cyst. Whether MucR is required only for the modification of the alginate chains contained in the exine and intine layers of the cyst or is also involved in the synthesis of other components of the cyst coat is not known. Given the important physiological and morphological changes occurring during early stages of differentiation, such as the loss of the flagella or the arrest of DNA synthesis, we cannot rule out the existence of additional processes under the control of the c-di-GMP signaling regulatory cascade that depends on MucR.

In the companion paper (23), we demonstrate that in *A. vinelandii* c-di-GMP favors the synthesis of longer alginate chains in an AvGReg- and MucG-dependent manner. AvGReg is a globin-coupled sensor DGC that is necessary for alginate production, while MucG is a PDE that negatively regulates this biosynthetic pathway; these proteins appear to act at a different stage of the biosynthesis of alginate, compared to MucR. Thus, it appears that MucG, together with the DGC AvGReg, affects alginate polymerization, perhaps by targeting Alg44. On the other hand, MucR, together with a currently unidentified c-di-GMP receptor (perhaps FleQ), affects alginate modification by regulating the transcription of genes encoding C-5 mannuronan epimerases. This regulatory scheme suggests that not only the amount but also the physical properties of this polymer are tightly controlled in response to environmental conditions.

In *P. aeruginosa*, AlgR is a key transcriptional regulator required for the expression of multiple virulence factors, including alginate (34–37), and modulation of the pool of c-di-GMP via *mucR* transcription (19). Although AlgR was not essential for alginate production in *A. vinelandii*, it was required for structuring the alginate cyst coats (21). In the present study, we found that, as in *P. aeruginosa*, *mucR* in *A. vinelandii* is directly regulated by AlgR. AlgR abundance was 22-fold higher in soluble protein extracts from cysts, compared to vegetative cells (10), which explains the higher levels of *mucR* transcription during cell differentiation, favoring accumulation of c-di-GMP and cell cycle progression. In *P. aeruginosa*, phosphorylation of AlgR by the histidine kinase FimS (also named AlgZ) leads to the differential regulation of target genes. In its

TABLE 1 Strains and plasmid used in the present study

Strain or plasmid	Genotype and relevant characteristics ^a	Source or reference
Bacterial strains		
<i>A. vinelandii</i>		
AEIV (also named E strain)	WT strain	43
ICM01	AEIV derivative carrying a $\Delta mucR::Gm$ mutation	This work
ICM09	ICM01 derivative complemented with WT copy of <i>mucR</i> integrated into its native locus in the chromosome; Gm ^r Km ^r	This work
CN100	AEIV derivative carrying a $\Delta algR::Km$ mutation	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA</i>	45
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hdsS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen
Plasmids		
pJET1.2/Blunt vector	PCR cloning vector; Ap ^r	Thermo Fisher Scientific
pBSL141	Source of the Gm ^r cassette	49
pBSL128	Source of the Km ^r cassette	49
pET-21a(+)	Expression vector	Novagen
pBBR1MCS-2	Cloning vector; Km ^r	50
pJG99	pJET1.2/Blunt vector derivative carrying a 2.6-kb fragment containing the <i>mucR</i> gene	This work
pJG100	pJG99 derivative carrying a $\Delta mucR::Gm$ mutation; used to construct the mutant ICM01	This work
pJG99-Km	pJG99 derivative carrying a Km ^r cassette as a selection marker at a Scal site of the multiple cloning site; used to construct the complemented strain ICM09	This work
pJG98	pJET1.2/Blunt vector derivative carrying a $\Delta algR::Km$ construction; linearized with Scal and used to construct the mutant CN100	This work
pETR-3P	pET-21a(+) vector derivative expressing the AlgR protein carrying a His ₆ tag at the N terminus	This work

^aGm, gentamicin; Gm^r, gentamicin resistance; Ap^r, ampicillin resistance; Km, kanamycin; Km^r, kanamycin resistance.

phosphorylated form, AlgR is required for the transcriptional activation/modulation of genes necessary for the synthesis of virulence factors, such as rhamnolipids, twitching motility-related proteins, siderophores, or hydrogen cyanide-producing proteins, among others (34, 36, 38–40). However, AlgR is also capable of activating *algD* transcription, for the production of alginate, in a phosphorylation-independent manner (37). At present, it is unclear whether AlgR needs to be phosphorylated by FimS for the transcriptional activation of *mucR* in *P. aeruginosa* (19). FimS is not present in *A. vinelandii* (21); therefore, it is possible either that a different histidine kinase or phospho-donor regulates AlgR or that AlgR activates *mucR* transcription in a nonphosphorylated state.

It is unclear what type of signals are responsible for the increased accumulation of c-di-GMP during encystment. Although *A. vinelandii* is a strict aerobic bacterium, during encystment it faces significant changes in respiratory activity, accompanied by a reduction in oxygen uptake rates and suppression of the activity of the NADH dehydrogenase (8). Thus, it is likely that this bacterium regulates its metabolism, including the amount of alginate and its physical properties, in response to the redox state and/or oxygen availability. MucR contains three MHYT domains, which are signaling domains predicted to bind diatomic gases such as NO, CO, and O₂. In *P. aeruginosa*, it has been proposed that NO acts as a signaling molecule detected by the MHYT domains of MucR, regulating the activity of the output GGDEF and EAL domains (18, 22, 41). The MHYT domains have also been implicated in detecting the redox state by means of a coordinated Cu²⁺ ion (42).

We are beginning to recognize another level of complexity in the regulation of alginate biosynthesis in *A. vinelandii*, where multiple c-di-GMP signaling modules appear to regulate the structure and abundance of this exopolysaccharide of great biotechnological, medical, and ecological significance.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this work are listed in Tables 1 and 2. The *A. vinelandii* WT strain AEIV (also named E strain) (43) was used in this work. Vegetative *A. vinelandii* growth was conducted in Burk's nitrogen-free salts medium supplemented

TABLE 2 Sequences of the primers used in this study

Name	Nucleotide sequence (5' to 3')	Template	Used for
mucR-F	CAATGCAGACCAGTCGCGCTC	Chromosomal DNA WT	Plasmid pJG99
mucR-R	CTTCGGCTGTGTCTCTGCCAG		
algR km-1	CTGTTTCAGGCCGTCGATG	Chromosomal DNA WT	Plasmid pJG98
algR km-2	CACTACCAGACGGCTG		
algR km-3	CAGCCGTCTGGTGTGACCTGGGATGAATGTCAGCTAC	pBRIMMCS-2	
algR km-4	TGCGATGGATGCGCACGAGAAGCGCGCGTGAATCG		
algR km-5	CGTGCGCATCCATCGCA	Chromosomal DNA WT	
algR km-6	GTCTCCAGTCTCTTGAC		
gyrAfw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	NA ^a	qPCR, internal control
gyrArev	TCGTCCAGCGCAACAGGT		
FwRT- <i>algE1-6</i>	CACGAGCAGACCATCAACCTG	NA	qPCR, <i>algE1</i> to <i>algE6</i>
RvRT- <i>algE1-6</i>	ATGTTGAAGCCGTGGCGGTCGTTG		
FwRT- <i>eexD</i>	GGTGACTATGGGCTCTCTGG	NA	qPCR, <i>eexD</i>
RvRT- <i>eexD</i>	CTCGCCCGTATACATCTCG		
mucR-Rv-primer	GTGTAGGAGGGCAGGATGG	NA	Primer extension, <i>mucR</i>
algRBamP	CAAGGATCCAATGTTCTGATCGTC	Chromosomal DNA WT	pETR-3P
algRHindP	CACAAGCTTGAGGCCAGTTGATT		
mucR-F-2-sites	GAATCCCATCACGCCGACTG	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS1 and BS2 sites
mucR-R-2-sites	GACGCTCCGTACTGCGTAAG		
mucR-F-site 1	GCTTCCCCGGCATCCCAATA	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS1 site
mucR-R-2-sites	GACGCTCCGTACTGCGTAAG		
mucR-F-2-sites	GAATCCCATCACGCCGACTG	Chromosomal DNA WT	EMSA, BS2 site
mucR-R-site2	CTACGCCAAAACGCCGAGAG		

^aNA, not applicable.

with 20 g liter⁻¹ of sucrose (Burk's-sucrose medium). The composition of the culture medium has been described elsewhere (44). Cultures were grown in 250-ml Erlenmeyer flasks with 50 ml of filling volume at 200 rpm and 30°C. For encystment induction, vegetative *A. vinelandii* cells (grown for 48 h in 50 ml of Burk's-sucrose medium) were collected by centrifugation and washed three times with Burk's buffer (the same mineral medium without a carbon source) to remove traces of sucrose. The cells were resuspended in 1 ml of Burk's buffer, and 200 μ l of this suspension was plated over the surface of solid Burk's medium supplemented with 0.2% (vol/vol) *n*-butanol (Burk's-butanol medium), which induces cell differentiation. The plates were incubated for 5 days to allow completion of the differentiation process. In order to have a synchronous suspension of encystment-induced cells, when indicated the vegetative cells were resuspended in the same volume of fresh liquid Burk's-butanol medium and incubated for the indicated times.

Escherichia coli DH5 α cells were grown in lysogeny broth (LB) at 37°C (45, 46). When needed, the final antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli* were as follows: gentamicin, 1 and 10 μ g ml⁻¹; kanamycin (Km), 1 and 10 μ g ml⁻¹; ampicillin, not used and 200 μ g ml⁻¹, respectively.

DNA manipulation. All DNA manipulations were performed following standard protocols (47). PCR amplifications were performed using the high-fidelity Phusion DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs. Plasmid isolation and DNA purification were performed using kits from Thermo Fisher Scientific, following the instructions of the manufacturer. All constructs were sequenced to verify sequence integrity and fidelity. DNA sequencing was conducted by the Sanger method, using fluorescent dideoxy terminators and a cycle sequencing method in a 3130xl analyzer (Applied Biosystems).

Construction of *A. vinelandii* mutants. Construction of the plasmids used to build *A. vinelandii* mutants is described in Table 1. *A. vinelandii* transformation was conducted using the natural competent state induced under iron-limited growth conditions, as described previously (44, 48). Competent *A. vinelandii* cells were transformed with plasmid DNA carrying the desired mutation and previously linearized to ensure double reciprocal recombination and allelic exchange. Transformants were selected on Burk's-sucrose medium amended with the corresponding antibiotic. Due to the polyploid nature of *A. vinelandii*, gene inactivation in all of the chromosomal copies was confirmed by PCR analysis.

For the construction of a MucR-deficient mutant, a fragment of 2.6 kb carrying the *mucR* gene was PCR amplified using the primer pair mucR-F/mucR-R and was ligated to plasmid pJET 1.2/Blunt (Thermo Fisher Scientific). The resulting vector, named pJG99, was excised with BssHI enzyme, deleting an internal *mucR* fragment of 1.5 kb that was replaced by a gentamicin resistance cassette released with the same enzyme from vector pBSL141 (49). The plasmid generated was named pJG100 and carried the resistance cassette ligated in the same orientation as that of *mucR* transcription. This plasmid, previously linearized with the Scal endonuclease, was used to transform AEIV cells, generating strain ICM01 (Δ *mucR*). To genetically complement mutant ICM01, a WT copy of the *mucR* gene was introduced into the *mucR* chromosomal locus. To this end, a HindIII fragment carrying a Km resistance (Km^r) cassette from plasmid pBSL128 (49) was ligated to the polylinker of plasmid pJG99 (*mucR*⁺), generating pGJ99-Km. This plasmid, which is unable to replicate in *A. vinelandii*, was introduced into ICM01 by transformation and Km^r single recombinants were selected; one such transformant, named ICM09, was chosen for further characterization.

A strain carrying a deletion of the entire *algR* gene, $\Delta algR::Km$, was constructed and was named CN100. A $\Delta algR::Km$ mutation was constructed by recombinant PCR. The three following PCR products were assembled in the order of appearance by overlapping PCR: (i) 458 bp upstream of *algR* (from -439 to +26 with respect to the ATG start codon); (ii) 1,112 bp corresponding to the Km^r cassette from plasmid pBBR1MCS-2 (50); and (iii) 536 bp downstream of *algR* (from +598 to +1117 with respect to the ATG start codon). The Km^r cassette was inserted in the same orientation as *algR* transcription. The $\Delta algR::Km$ construction was cloned into pJET1.2/Blunt vector, giving rise to plasmid pJG98. Finally, this was linearized with endonuclease *ScaI* and transformed into WT competent cells, generating mutant CN100.

Nucleotide isolation and c-di-GMP quantification. c-di-GMP quantification was conducted following a protocol previously described (51). For nucleotide extraction, 47 ml of cell culture induced for encystment 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 ultraperformance 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 in 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 (52).

Resistance to desiccation. Resistance to desiccation was assessed as reported previously (53). In brief, cells of *A. vinelandii* grown for 48 h in 50 ml of liquid Burk's-sucrose medium were collected by centrifugation and washed three times with Burk's buffer to remove traces of sucrose. After this, the cells were resuspended in 1 ml of Burk's buffer; 200 μ l of this suspension was spread on the surface of Burk's-butanol solid medium and incubated for 5 days at 30°C. After this time, the encystment-induced cells were collected and resuspended in 10 mM MgSO₄. Approximately 10⁶ CFU was applied to Millipore membranes of 0.2- μ m pore size; when dried, they were incubated for 5 days at 30°C, with only mature cysts being able to survive. After this time, the membranes were soaked for 5 h in Burk's buffer and the cells were released by vortex mixing. Viable cell counts before and after desiccation were determined in serial dilutions.

Electron microscopy assays. Visualization of *A. vinelandii* cysts was performed by following a previously reported protocol with some modifications (54). Cells for which encystment had been induced for 5 days in liquid Burk's-butanol medium were collected and washed three times with phosphate buffer (pH 7.2) at 4°C. They were then washed with 0.16 M sodium cacodylate buffer and fixed with a paraformaldehyde (4%)-glutaraldehyde (2%) mixture for 1 h at room temperature. After the cells were washed again with 0.16 M sodium cacodylate, they were fixed with 2% osmium tetroxide for 2 h at 4°C. Following fixation, cell suspensions were washed and then dehydrated by passage through a graded ethanol series. After exposure to propylene oxide, samples were embedded in an Epon 812 resin, which was allowed to polymerize for 24 h at 65°C. Ultrathin sections were cut, incubated with uranyl acetate, washed with distilled water, treated with lead citrate, washed again, and observed with a Zeiss transmission electron microscope (model Libra 120, at 80 kV).

Analytical methods. To determine specific alginate production, the strains were cultivated under encysting conditions on plates of Burk's-butanol medium for 48 h. The presence of 0.2% *n*-butanol as the sole carbon source triggers cellular differentiation in about 95% of the population (7, 8), allowing synchronization of the cellular response during encystment. After 48 h, the cells were harvested and washed twice with 10 ml of Burk's buffer to extract the alginate. After centrifugation, the cells were used to determine the total protein content by the Lowry method (52). The alginate from the supernatants was precipitated with 3 volumes of cold 2-propanol, washed twice with 70% ethanol, dried, and resuspended in 1 ml of distilled water. Alginate was quantitated by the spectrophotometric determination of uronic acids with carbazole (55).

Quantitative real-time reverse transcription. Total RNA was extracted as described (56) from cells grown in liquid Burk's-sucrose or Burk's-butanol medium for 48 h. Genomic DNA contamination was removed with DNase I (Thermo Fisher Scientific). Details of cDNA synthesis and reverse transcription-qPCR amplification conditions have been reported elsewhere (44). The relative levels of *algE1* to *algE6* and *eexD* were determined by comparing the quantity of each mRNA under the tested conditions, using *gyrA* (Avin_15810) mRNA as an internal control. The sequences of the primer pairs used are listed in Table 2. These primers were designed using the Primer3 program (<http://bioinfo.ut.ee/primer3>) (optimal length of 20 bases and melting temperature of 60°C). Validation of each primer set was conducted by verifying specific single-product amplification by melting curve analyses. Three biological replicates (independent cultures) were performed, with three technical replicates for each one. Similar results were obtained for the transcription of all measured genes in the repetitions. A no-template control reaction was included for each gene. The quantification technique used to analyze the data generated was the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported previously (57).

Detection of AlgE-type C-5 epimerases. Western blot assays to detect AlgE epimerases were performed as described previously, using anti-AlgE4 antibodies (24), with some modifications. Cells of *A. vinelandii* were cultivated on plates of Burk's-butanol medium for 5 days; after this time, the proteins associated with the cell were extracted. To this end, cells were collected, washed with 1 ml of 50 mM Tris (pH 7.8), centrifuged for 10 min, resuspended in 0.5 ml of 50 mM Tris-3 mM Na₂EDTA, and shaken at 250 rpm for 15 min. The cell suspension was centrifuged, and the supernatant contained the epimerases associated with the surface of the central body. The proteins were blotted as described (24).

Primer extension assay. The transcription start site of *mucR* was mapped by primer extension analysis under vegetative conditions. Total RNA was extracted from the *A. vinelandii* WT strain and from mutant CN100 (Δ *algR::Km*) grown in Burk's-sucrose medium for 48 h. The oligonucleotide used as a primer for the extension was end labeled with [γ - 32 P]ATP and T4 polynucleotide kinase (Roche). Primer extension was performed at 42°C with avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Roche), as indicated by the supplier. The extended cDNA product was analyzed by electrophoresis on a denaturing 6% urea-polyacrylamide gel, in parallel with a DNA sequence ladder produced with the same primer by using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit (USB). Plasmid pJG99, carrying the regulatory region of *mucR*, was used as a DNA template. We were unable to identify the *mucR* transcription start sites under encysting conditions using this technique, which could be related to the limited amount of total RNA extracted from cells undergoing differentiation.

Expression and purification of AlgR-His protein. The AlgR protein was purified as a recombinant protein with a 6 \times His tag at the C terminus (AlgR-His). To produce this recombinant protein, the *algR* gene was cloned in the expression vector pET-21a(+) (Novagen), generating pETR-3P. The *E. coli* BL21 strain was transformed with plasmid pETR-3P, and overproduction of AlgR-His was induced by addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to cells grown to mid-log phase ($A_{600} = 0.5$). After 4 h of induction at 37°C, cells were collected by centrifugation and disrupted by sonication in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). Lysed cells were centrifuged for 30 min at 20,000 \times g at 4°C, and the supernatant was loaded onto an equilibrated column containing the nickel resin Ni-nitrilotriacetic acid-agarose. The column was washed twice with washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole), and the protein was eluted with elution buffer I (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole). The protein was concentrated by using Microcon YM-10 centrifugal filters (Amicon) and stored in elution buffer II (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). Protein concentrations were determined by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard (52). SDS-PAGE of the purified protein revealed the expected molecular mass of approximately 28 kDa.

Electrophoretic mobility shift assays. EMSAs were conducted using a nonradioactive method reported previously (27, 28). Regions of various lengths upstream of *mucR* were amplified by PCR, as follows: (i) 438 bp containing the entire regulatory region; (ii) 211 bp containing only AlgR binding site 2; and (iii) 114 bp containing only AlgR binding site 1. Binding reactions were performed by mixing an individual PCR product (100 ng) with increasing concentrations of purified AlgR-His protein in binding buffer (10 mM Tris [pH 8], 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 10 μ g/ml bovine serum albumin), in a total volume of 20 μ l. These reaction mixtures were incubated at room temperature for 20 min and then analyzed by electrophoresis on 6% nondenaturing acrylamide gels run with 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer. The migration of the DNA fragments was visualized by staining with ethidium bromide and excitation under UV illumination.

Statistical analysis. GraphPad Prism (version 6.0) software (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for statistical analyses. Statistical significance was assessed using two-tailed, unpaired Student's *t* tests, and *P* values of ≤ 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Ainsworth and M. Tabche for computational and technical support and G. Zavala for the acquisition of electron microscopy images. We thank H. Ertesvåg for kindly providing the anti-AlgE4 antibodies and G. Soberón-Chávez and G. O'Toole for critical reading of the manuscript.

I.C.M.-O. is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and has received a CONACyT fellowship (no. 596217). This work was supported by project PAPIIT IN204818 (UNAM) to C.N. and NIH grants GM109259 and AI144395 to C.M.W.

REFERENCES

- Skotnicka D, Smaldone GT, Petters T, Trampari E, Liang J, Kaefer V, Malone JG, Singer M, Søgaard-Andersen L. 2016. A minimal threshold of c-di-GMP is essential for fruiting body formation and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *PLoS Genet* 12:e1006080. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006080>.
- Jenal U, Reinders A, Lori C. 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* 15:271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.
- Marden JN, Dong Q, Roychowdhury S, Berleman JE, Bauer CE. 2011. Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development: cGMP control of encystment. *Mol Microbiol* 79:600–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07513.x>.
- Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. 2011. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* 12:594–601. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.77>.
- Romling 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>.
- Galperin MY. 2010. Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13:150–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- 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>.
- Sadoff HL. 1975. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev* 39:516–539. <https://doi.org/10.1128/MMBR.39.4.516-539.1975>.
- 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>.
10. Chowdhury-Paul S, Pando-Robles V, Jiménez-Jacinto V, Segura D, Espín G, Núñez C. 2018. Proteomic analysis revealed proteins induced upon *Azotobacter vinelandii* encystment. *J Proteomics* 181:47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.031>.
 11. 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>.
 12. 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>.
 13. 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>.
 14. 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>.
 15. Ertesvåg H. 2015. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Front Microbiol* 6:523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>.
 16. 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>.
 17. Gimmestad M, Steigedal M, Ertesvåg H, Moreno S, Christensen BE, Espin 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>.
 18. 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>.
 19. 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>.
 20. Mohr CD, Leveau JH, Krieg DP, Hibler NS, Deretic V. 1992. AlgR-binding sites within the *algD* promoter make up a set of inverted repeats separated by a large intervening segment of DNA. *J Bacteriol* 174:6624–6633. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6624-6633.1992>.
 21. Núñez C, Moreno S, Soberón-Chávez G, Espín G. 1999. The *Azotobacter vinelandii* response regulator AlgR is essential for cyst formation. *J Bacteriol* 181:141–148. <https://doi.org/10.1128/JB.181.1.141-148.1999>.
 22. Li Y, Heine S, Entian M, Sauer K, Frankenberg-Dinkel N. 2013. NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J Bacteriol* 195:3531–3542. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-12>.
 23. 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>.
 24. Høidal 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>.
 25. Høidal HK, Ertesvåg H, Skjåk-Braek G, Stokke BT, Valla S. 1999. The recombinant *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5-epimerase AlgE4 epimerizes alginate by a nonrandom attack mechanism. *J Biol Chem* 274:12316–12322. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12316>.
 26. Moreno S, Ertesvåg H, Valla S, Núñez C, Espin G, Cocotl-Yañez M. 2018. RpoS controls the expression and the transport of the AlgE1–7 epimerases in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett* 365:fny210. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny210>.
 27. Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14591–14596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>.
 28. Martínez-Flores I, Pérez-Morales D, Sánchez-Pérez M, Paredes CC, Collado-Vides J, Salgado H, Bustamante VH. 2016. In silico clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Sci Rep* 6:37858. <https://doi.org/10.1038/srep37858>.
 29. Konovalova A, Petters T, Søgaard-Andersen L. 2010. Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Rev* 34:89–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00194.x>.
 30. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>.
 31. Matsuyama A, Krasteva PV, Baraquet C, Harwood CS, Sondermann H, Navarro MVA. 2016. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E209–E218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523148113>.
 32. Baraquet C, Harwood CS. 2016. FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 198:178–186. <https://doi.org/10.1128/JB.00539-15>.
 33. Munch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M, Jahn D. 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics* 21:4187–4189. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti635>.
 34. Okkotsu Y, Tiekou P, Fitzsimmons LF, Churchill ME, Schurr MJ. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation modulates rhamnolipid production and motility. *J Bacteriol* 195:5499–5515. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-13>.
 35. Lizewski SE, Lundberg DS, Schurr MJ. 2002. The transcriptional regulator AlgR is essential for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 70:6083–6093. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6083-6093.2002>.
 36. Whitchurch CB, Alm RA, Mattick JS. 1996. The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9839–9843. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9839>.
 37. 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*. *J Bacteriol* 180:956–968. <https://doi.org/10.1128/JB.180.4.956-968.1998>.
 38. Little AS, Okkotsu Y, Reinhart AA, Damron FH, Barbier M, Barrett B, Oglesby-Sherrouse AG, Goldberg JB, Cody WL, Schurr MJ, Vasil ML, Schurr MJ. 2018. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation status differentially regulates pyocyanin and pyoverdine production. *mBio* 9:e02318-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02318-17>.
 39. Whitchurch CB, Erova TE, Emery JA, Sargent JL, Harris JM, Semmler ABT, Young MD, Mattick JS, Wozniak DJ. 2002. Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* response regulator AlgR is essential for type IV fimbria-mediated twitching motility. *J Bacteriol* 184:4544–4554. <https://doi.org/10.1128/jb.184.16.4544-4554.2002>.
 40. Cody WL, Pritchett CL, Jones AK, Carterson AJ, Jackson D, Frisk A, Wolfgang MC, Schurr MJ. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR controls cyanide production in an AlgZ-dependent manner. *J Bacteriol* 191:2993–3002. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-08>.
 41. Wang Y, Hay ID, Rehman ZU, Rehm BHA. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7253–7265. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6591-4>.
 42. Galperin MY, Gaidenko TA, Mulikidjanian AY, Nakano M, Price CW. 2001. MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett* 205:17–23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10919.x>.
 43. Larsen B, Haug A. 1971. Biosynthesis of alginate. *Carbohydr Res* 17:287–296. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)82536-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)82536-7).
 44. 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>.
45. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166:557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8).
46. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
47. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual, 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
48. Page WJ, Sadoff HL. 1976. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol 125:1080–1087. <https://doi.org/10.1128/JB.125.3.1080-1087.1976>.
49. 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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-i](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-i).
50. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166:175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1).
51. 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>.
52. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275.
53. Moreno S, Nájera R, Guzmán J, Soberón-Chávez G, Espín G. 1998. Role of alternative sigma factor *algU* in encystment of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol 180:2766–2769. <https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2766-2769.1998>.
54. Mejía-Ruiz H, Moreno S, Guzmán J, Nájera R, León R, Soberón-Chávez G, Espín G. 1997. Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* *algK* mutant. FEMS Microbiol Lett 156:101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12712.x>.
55. 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).
56. Barry T, Geary S, Hannify S, MacGearailt C, Shalloo M, Heery D, Gannon F, Powell R. 1992. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. Nucleic Acids Res 20:4940. <https://doi.org/10.1093/nar/20.18.4940>.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Capítulo II:

El estudio de la proteína RimK y su posible función como efectora de c-di-GMP durante la diferenciación celular en *A. vinelandii*

2 ANTECEDENTES

2.1 El c-di-GMP y la modificación ribosomal

El control post transcripcional es un importante mecanismo que permite a las bacterias responder a los cambios ambientales. En especies del género *Pseudomonas*, se ha descrito una red de regulación que involucra la modificación ribosomal por la proteína RimK la cual funciona como glutamil ligasa dependiente de ATP, añadiendo residuos de glutamato a la proteína ribosomal RpsF (Figura 26); de esta manera, induce cambios en el comportamiento y función del ribosoma, modificando así el patrón proteico (Little et al., 2016). La actividad de RimK es controlada por la interacción con las proteínas RimA, RimB y el c-di-GMP (Grenga et al., 2020).

En *P. fluorescens* los genes *rimABK* se expresan a partir de un operón policistrónico e interactúan directamente para lograr la afinación del proteoma durante la colonización de la rizosfera en la planta. RimA es una enzima multifuncional (“fosfodiesterasa trigger”) es decir que se trata de una PDE catalíticamente activa, pero capaz de interactuar de manera específica y directa con RimK para controlar su actividad mediante la unión y degradación de c-di-GMP (Hengge, 2016); mientras que RimB, es una proteasa que muestra similitud con las proteasas ATP-dependientes capaces de unir Zinc y cuyo sustrato específico es el glutamato, la actividad glutamil-transferasa de RimK junto a la actividad poliglutamil-proteasa de RimB dan como resultado cadenas de cuatro residuos de glutamato en el C-terminal de RpsF (Grenga et al., 2020).

La proteína RimK pertenece a la super Familia ATP-Grasp, estas proteínas muestran una secuencia con identidad baja entre ellas (10-20%). Actúan formando un tetrámero que contiene dos protómeros de RimK estructuralmente diferentes en

formas abiertas y cerradas (Arimura et al., 2018), posee una estructura tridimensional similar, definida por un pliegue que funciona como “agarradera de ATP” (Zhao et al., 2013) con tres dominios A, B y C. El doblez para captar ATP se encuentra entre láminas β que conforman los dominios B y C y su centro catalítico es localizado en la hendidura formada por la conjunción de los tres dominios. Esta proteína puede catalizar la síntesis de ácido-poli- α -glutámico de manera dependiente del ATP, tiene como sustrato estricto y específico el uso de Glu y no de Glu-Glu (Kino et al., 2011). Su rol es importante al modificar de manera postraduccional la actividad ribosomal (Murina et al., 2019).

Un estudio del perfil proteómico exclusivo del quiste de *A. vinelandii* identificó aumento en la expresión de la proteína Avin_05140, un homólogo de la proteína RimK (Chowdhury-Paul et al., 2018), lo que la señala como una proteína importante en el proceso de diferenciación celular. Por tal razón, en este trabajo nos propusimos abordar esta pregunta.

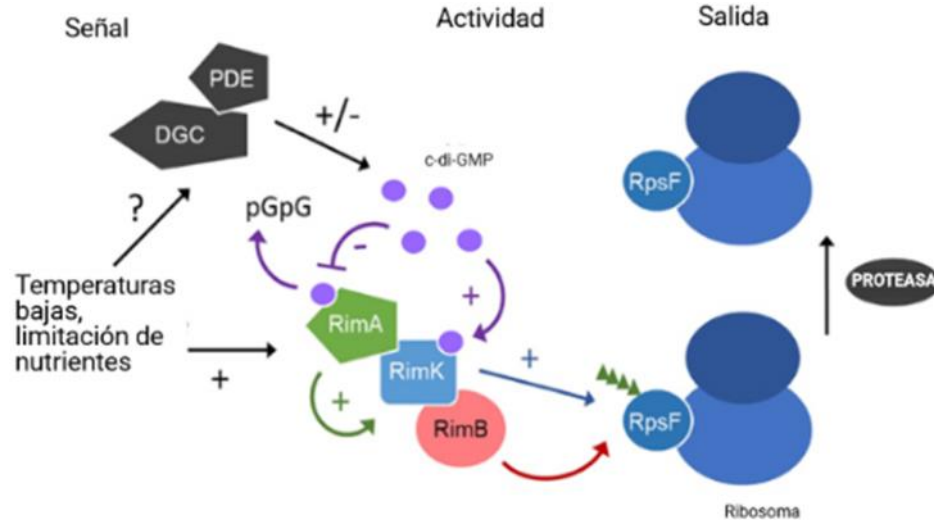


Figura 26. Modelo de interacción del sistema Rim en *Pseudomonas fluorescens*. La actividad de RimK (Rectángulo azul) es estimulada por la interacción directa con RimA (pentágono verde) y el c-di-GMP (círculos morados). El c-di-GMP también interactúa con RimA quien es la encargada de hidrolizarlo a pGpG. La actividad combinada de la glutamil-ligasa RimK y la glutamil-proteasa RimB (óvalo rojo) adiciona cuatro residuos de glutamato (triángulos verdes) en el C-terminal de la proteína ribosomal RpsF (óvalo azul). Entre las señales conocidas que cambian la expresión del sistema *RimABK*, están la estimulación por bajas temperaturas, la limitación de nutrientes, la concentración de glutamato y la concentración de c-di-GMP. El recambio en los niveles de c-di-GMP es controlado por alguna diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa aun desconocidas (pentágonos grises) . Tomado de (Little et al., 2016).

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este apartado se enlistan en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Nombre	Genotipo/Características Relevantes	Referencia
Cepas bacterianas		
<u><i>A. vinelandii</i></u>		
AEIV (también llamado cepa E)	Cepa silvestre de <i>A. vinelandii</i>	(Larsen & Haug, 1971)
ICMO13	Derivada de AEIV lleva una mutación en el gen $\Delta rimK::GM$.	Este trabajo
JG541	Derivada $\Delta rimK$ lleva una copia del gen silvestre <i>rimK</i> de <i>P. fluorescens</i> integrado en el locus nativo del cromosoma. Km ^r . Gm ^r	Este trabajo
<u><i>P. fluorescens</i></u>		
SBW25	Cepa silvestre de <i>P. fluorescens</i>	Little 2016
SBW25 $\Delta rimK$	Derivada de SBW25 lleva una mutación en el gen <i>rimK</i> ($\Delta rimK::Cm$).	Little 2016
ICMO15	Derivada de SBW25 $\Delta rimK$ lleva una copia del gen silvestre <i>rimK</i> de <i>A. vinelandii</i> integrado en el locus nativo del cromosoma. Km ^r . Tc ^r	Este trabajo
<u><i>E. coli</i></u>		
DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen
Plásmidos		

pJET1.2/Blunt vector	Vector de clonación; Apr ^r	Thermo Fisher Scientific
pME6032	Vector de clonación; Cm ^r	Novagen
pBSL128	Fuente del cassette de Km ^r	(Alexeyev et al., 1995)
pET-22b(+)	Vector de expresión	Novagen
pET-28a(+)	Vector de expresión	Novagen
pBBR1MCS-2	Vector de clonación Km ^r	(Kovach et al., 1995)
pET-22_rimK	Derivada del vector pET-22b utilizado para expresar la proteína RimK. lleva una etiqueta H6 en el C- terminal	Este trabajo
pET-28_rimB	Derivada del vector pET-28a utilizado para expresar la proteína RimB. Lleva una etiqueta H6 en el N- terminal	Este trabajo
pET-28_rpsF	Derivada del vector pET-28a utilizado para expresar la proteína RpsF lleva una etiqueta H6 en el N- terminal	Este trabajo
pJG540	Derivada del vector pJET1.2/Blunt lleva una construcción de $\Delta rimK::Km$. Este plásmido, previamente linealizado con EcoRI, fue usado para construir la mutante $\Delta rimK$.	Este trabajo
pJG541	Derivada del vector pME6032 utilizado para complementar la mutante $\Delta rimK$ con una copia del gen silvestre <i>rimK</i> de <i>P. fluorescens</i> .	Little 2016.
pCM11	Derivada del vector pME6032 utilizado para complementar la mutante $\Delta rimK$ de <i>P. fluorescens</i> con una copia del gen silvestre <i>rimK</i> de <i>A. vinelandii</i> .	Este trabajo

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre	Secuencia de nucleótidos (5'–3')	Plantilla	Uso
rimK-FwD	CCCGCTGGTGATGGAAGTGAAC		
rimK-RvD	AAGGATCCGTCGATCACGACCATC TG	ADN cromosomal WT	$\Delta rimK$
AvRimK- EcoFor1	CGGAATTCATGAAAATCGCCGTGC		
AvRimK- KpnRev1	GGGGTACCTCAGCCCTTGCCGCG	pJG110	pME6032_ <i>rimK</i> _Av
rimK-Fw	GTCGTGCCGCTAAAAGTAGTATAC	ADN	
rimK-Rv	TCGAGTCAGCCCTTGCCGCGGGTC C	cromosomal WT	pET-22_ <i>rimK</i>
rimB-Fw	CATATGGTGATTGGTCTGCGCGAA	ADN	
rimB-Rv	GGATCCTCATTGGACACCAAGCAG	cromosomal WT	pET-28_ <i>rimB</i>
rpsF-Fw	CATATGATGCGTCATTACGAAATCA	ADN	
rpsF-Rv	GGATCCTTACTCGTCAGCCTTGTC	cromosomal WT	pET-28_ <i>rpsF</i>

2.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo para *A. vinelandii* son las mismas descritas en el capítulo I para crecimiento vegetativo y de inducción al enquistamiento. Las cepas de *E. coli* y *P. fluorescens* fueron crecidas en medio Luria Bertani cuya composición es la siguiente (g/l): bacto peptona, 10; extracto de levadura, 5; cloruro de sodio, a 37 °C (*E. coli*) y 28 °C (*P. fluorescens*). Cuando fue necesario, las concentraciones finales de antibióticos (en $\mu\text{g ml}^{-1}$) utilizados para *A. vinelandii* y *E. coli* fueron las siguientes: gentamicina (Gm), 1 y 10; kanamicina (Km) 1 y 10; ampicilina (Ap), no utilizada y 200; cloramfenicol (Cm) 10 solamente para *P. fluorescens*. Para inducir la expresión de las proteínas se utilizó IPTG a una concentración de 1 mM. Para el ensayo de unión a rojo Congo se utilizó medio King B (KB) cuya composición (g/l) es la siguiente: peptona, 20; agar purificado, 12; K_2HPO_4 (anhidro), 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1.5 y se suplementó con el colorante rojo Congo a una concentración de 0.003%.

2.2.3 Construcción de la mutante *rimK*

Un fragmento de 906 pb del gen *rimK* fue amplificado por PCR utilizando el par de oligos rimK-FwD/ rimK-RvD, este fragmento fue ligado al plásmido pJET 1.2/ Blunt (Thermo Fisher Scientific). Se eliminó un fragmento interno de 0.5 kb con la enzima HindIII, que fue sustituido por un casete de resistencia a Km liberado con la misma enzima del vector pBSL128 (Alexeyev et al., 1995). El plásmido generado se denominó pJG540, y lleva el cassette de resistencia ligado en la misma orientación de la transcripción de *rimK*. Este plásmido, previamente linealizado con la endonucleasa EcoRI, fue utilizado para transformar las células de la cepa AEIV, generando la cepa ICMO13 ($\Delta rimK$).

2.2.4 Complementación genética cruzada de mutantes *rimK*

Mutante $\Delta rimK$ de *A. vinelandii*. Se introdujo una copia del gen *rimK* silvestre de *P. fluorescens* en el locus cromosomal de *rimK* en *A. vinelandii*. Para este fin, se utilizó un fragmento BamHI/EcoRI de un tamaño de 1.6 kb liberado del plásmido pME6032_ *rimK*, este fragmento se clonó en el vector pJET1.2/Blunt que contenía un cassette de resistencia a Gm previamente ligado, dando origen al plásmido pJG541 Este plásmido incapaz de replicarse en *A. vinelandii*, se introdujo en la cepa $\Delta rimK$ por transformación y se seleccionaron recombinantes simples Gm^r; que dio como resultado la cepa JG541 ($\Delta rimK$ / Pf *rimK*) que fué confirmada mediante PCR.

Mutante $\Delta rimK$ de *P. fluorescens*. Utilizando el plásmido pET-22_ *rimK* se levantó un fragmento EcoRI/KpnI de 906 pb que contiene el gen silvestre *rimK* de *A. vinelandii*, este fragmento se ligó en el vector pME6032 que contiene un casete de resistencia a Cm para generar el plásmido pCM11 utilizado para complementar la mutante $\Delta rimK$ de *P. fluorescens*. Se seleccionaron transformantes Cm resistentes y se confirmaron por PCR.

2.2.5 Ensayo de ATPasa

Este ensayo mide el cambio de absorbancia a 340 nm del NADH a medida que se oxida (Kino et al., 2011). La oxidación del NADH refleja el consumo de ATP. El ATP se regenera en la reacción y la pendiente de la descomposición del NADH (Abs_{340}) debe seguir una línea recta.

Soluciones:

Buffer - 50 mM TRIS-ClH; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 10 mM KCl pH 8.0
(25 ml 1M TRIS-ClH; 1 ml 1 M $MgCl_2$; 0.5 ml 1 M DTT; 5 ml 1 M KCl
pH 8.0)

ATP - 20 mM en buffer

NADH - 5 mM en 10 mM NaOH (400 μ M final); Sigma N8129

Fosfoenol-piruvato - 80 mM en H_2O (800 μ M concentración final)

Piruvato Kinasa/Lactato deshidrogenasa- Sigma # P0294 – 5 ml

Proteína RimK - 1 μ M

ATP diluciones (en Buffer): 15 mM, 10 mM, 7.5 mM, 5 mM, 2.5 mM y 1.25 mM (100 μ l de cada uno)

Para la primera muestra, se utilizaron los pozos A1-A8 y B1-B8 (duplicados) de una placa de 96 pozos para acomodar una titulación de ATP de 0; 0.125; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5 y 2.0 mM. Así, cuatro muestras pueden acomodarse en una sola placa. El volumen de reacción fué de 100 μ l: 90 μ l de una mezcla que contiene: 1 μ l PEP, 8 μ l NADH, 1.5 μ l PK/LDH y la proteína RimK a una concentración de 1 μ M. el volumen se ajustó con Buffer hasta los 90 μ l y posteriormente se añadieron 10 μ l de

ATP, lo que inicia la reacción, se pipetea suavemente al mezclar y se lee la reacción en un lector de placas a 25 °C por periodos de 1 min/ 90 minutos.

2.2.6 Ensayo de Rojo Congo

Este ensayo permite la identificación cualitativa de diferentes compuestos de la matriz extracelular como lo son exopolisacáridos, fibras amiloides, curly, etc.; se utilizó como método de detección de la formación de biopelícula, requisito indispensable para la colonización a la rizosfera por parte de *P. fluorescens* basándonos en protocolos previamente descritos (Jones & Wozniak, 2017; Reichhardt et al., 2016). Las cepas de *P. fluorescens* son crecidas toda la noche en 25 ml de medio LB líquido a 28 °C, estos cultivos son normalizados con la misma DO_{600} a 0.8 para inocular 50 ml de medio LB durante 48 h a 28 °C, posteriormente se realiza una siembra de gotas de 10 µl de cada muestra en placas que contienen 25 ml de medio KB al 1.3%, suplementadas con una solución de rojo Congo recién hecha a una concentración del 0,003%. Para fines comparativos, las muestras pueden colocarse en una misma placa dejando espacios de 2-3 cm entre ellas; se dejan secar bien bajo el flujo laminar, posteriormente son incubadas durante 48 h a 28 °C, transcurrido este tiempo las placas son retiradas y puestas bajo la luz polarizada para poder observar la tinción.

2.2.7 Purificación de las proteínas RimK, RimB y RpsF

Las cepas de *E. coli* BL21-(DE3) que portan los plásmidos pET-22_rimK, pET-28_rimB o pET-28_rpsF se cultivaron en 1 L de LB toda la noche a 30 °C. Se midió la absorbancia a 600 nm hasta obtener una DO de 0.6. En este punto la expresión de las proteínas se indujo con 1 mM IPTG durante 2 h. Las células se colectaron y se lisaron con ayuda de una prensa francesa. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad NTA-Ni. Se utilizaron columnas HiTrap (Amersham) equilibradas con 1 ml de la siguiente solución: 25 mM de KH₂PO₄, 200 mM de NaCl, pH 8.0 (para RimB y RimK de *A. vinelandii*), 50 mM Tris-Cl, 2.5% de glicerol, pH 8.0 (para RpsF de *A. vinelandii*) o 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 9.0 (para RpsF *E. coli*). Después de la inmovilización, la proteína se eluyó utilizando un 500 mM de imidazol sobre un volumen de elución de 15 ml.

2.2.8 Ensayos de glutamilación RpsF

El ensayo de glutamilación fue adaptado de (Kino et al., 2011). Las proteínas RpsF y RimK fueron purificadas para utilizarse en una proporción de 1:1 se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en un buffer de reacción que contiene: 20 mM de glutamato, 20 mM de ATP, 20 mM de MgSO₄-7H₂O, 100 mM de Tris-HCl a pH 9. A continuación, se analizaron los productos de la reacción mediante geles de SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida y se visualizaron con una mezcla coloidal de Coomassie, el marcador de peso molecular utilizado fue NEB #P7706. Para conocer si había relación entre la actividad de glutamil-transferasa de RimK y la proteína RimB, las reacciones se complementaron con una relación 1:1 de las proteínas RimB/RimK/RpsF purificadas. Los ensayos se repitieron por triplicado.

2.2.9 Ensayo de pull-down con c-di-GMP biotinilado

Los lisados celulares fueron preparados mediante la sonicación de 5 ml de cultivo de las cepas de *E. coli* que portan los plásmidos pET28_RimK y pBldD previamente inducidos con 0.5mM IPTG durante 5 horas a 28 °C. Las células lisadas fueron centrifugadas (20,000 g/1 h) y se colectaron 45 µl de la fracción soluble, posteriormente se mezclaron con 30 µl de c-di-GMP biotinilado (BioLog B098) a una

concentración final de 30 μM . Se añadió buffer de unión (25 mM de KH_2PO_4 , 200 mM de NaCl, pH 8.0) hasta aforar a 500 μl . Las muestras se incubaron toda la noche a 8 °C en agitación. A continuación, la posible interacción proteína-c-di-GMP se fijó mediante la irradiación con luz UV durante 4 minutos en un UV-Stratalinker (Stratagene). Se añadieron posteriormente 25 μl de cuentas magnéticas de estreptavidina (Invitrogen) seguido de una hora más de incubación a 8 °C en agitación. Las cuentas magnéticas de estreptavidina se recuperaron con un imán y se lavaron cinco veces con 200 μl de buffer de lavado (20 mM HEPES pH 7,5, 250 mM NaCl, 2 mM MgCl, 2,5% (v/v) de glicerol), para eliminar las proteínas no ligadas. Las muestras fueron luego corridas en un gel de SDS-PAGE y se visualizaron con una mezcla coloidal de Coomassie.

2.3 Resultados

2.3.1 RimK, una proteína putativa de unión a c-di-GMP, es esencial para la formación de quistes maduros.

En un estudio publicado por nuestro grupo de investigación se analizó el perfil proteómico del quiste de *A. vinelandii*. Entre otras proteínas, se encontró que la proteína Avin_05140 se expresa de manera exclusiva durante el proceso de diferenciación celular (Chowdhury-Paul et al., 2018). Esta proteína es homóloga a la proteína RimK de *E. coli* y de especies de *Pseudomonas*. Se encarga de la modificación del ribosoma por la adición de residuos glutámicos en la proteína RpsF (Zhao et al., 2013). Además, en *Pseudomonas* se ha descrito como un regulador postranscripcional dependiente de c-di-GMP (Little et al., 2016), para evaluar si RimK de *A. vinelandii* tiene un efecto positivo en la resistencia a la desecación, generamos la mutante CMO13, la cual porta una mutación $\Delta rimK$ (Figura 27A) y evaluamos su capacidad para generar quistes que resisten desecación. Los ensayos de enquistamiento indican que en la mutante $\Delta rimK$ se reduce aproximadamente 100 veces la capacidad de formar quistes maduros (Figura 27 B), lo que sugiere que en *A. vinelandii* la modificación ribosomal a través de RimK juega un rol clave durante el proceso de diferenciación celular.

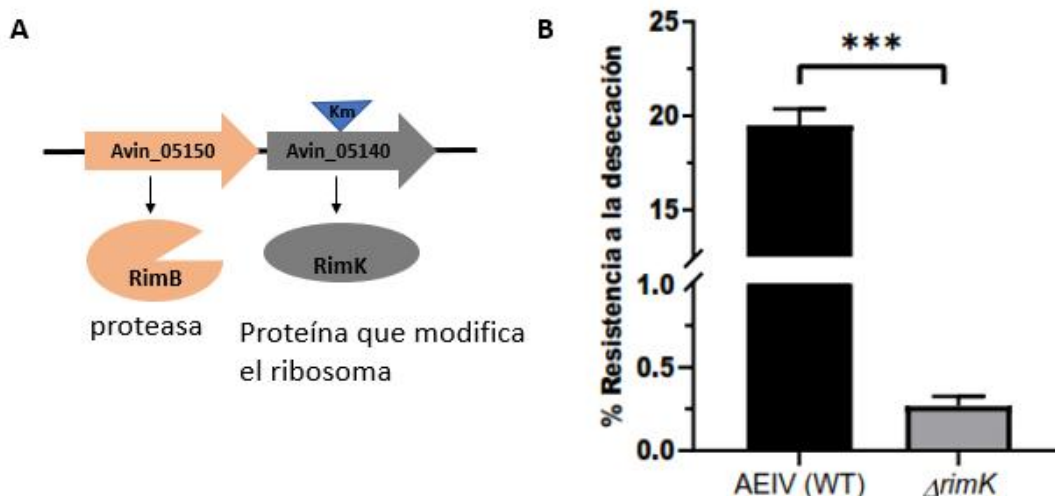


Figura 27. RimK es esencial para la formación de quistes maduros. **A.** Se muestra la inserción de un casete de resistencia a gentamicina para generar la mutante *rimK*. **B.** Porcentaje de resistencia a la desecación en la cepa mutante *rimK* y en la parental AEIV.

2.3.2 La proteína RimK de *A. vinelandii* tiene la capacidad de modificar el ribosoma

En *E. coli* y especies de *Pseudomonas* RimK es una α -glutamato ligasa, que cataliza la adición secuenciada de residuos de glutamato en el carboxilo terminal de la proteína RpsF de manera dependiente de ATP (Kino et al., 2011; Little et al., 2016). Para caracterizar bioquímicamente la actividad de RimK de *A. vinelandii*, se realizaron ensayos de glutamil-transferasa y ATPasa como se reportó anteriormente (Little et al., 2016).

Como se puede apreciar en los ensayos de glutamilación de RpsF por la proteína RimK de *A. vinelandii*, la movilidad electroforética de RpsF (17.3 kDa) cambia en presencia de glutamato, detectándose en la reacción la forma glutamilada como una banda con un tamaño ligeramente mayor que la proteína original (17.8 kDa aproximadamente) (Figura 28). Este resultado confirma la actividad glutamil-transferasa de RimK. Dicha actividad fue dependiente de ATP pues en su ausencia la densidad de la banda de RpsF no se modifica, mientras que en presencia de la proteína RimB no se observan modificaciones significativas bajo estas condiciones. Este ensayo demuestra que la proteína RimK de *A. vinelandii* es capaz de modificar a la proteína ribosomal RpsF de *E. coli*.

Posteriormente, exploramos la actividad ATPasa de RimK de *A. vinelandii*, utilizando un protocolo previamente reportado (Kino et al., 2011) y la proteína RimK purificada. La actividad ATPasa de la proteína RimK mostró una V_{max} de 219 nmol/min/mg proteína con una K_m 1.03 ± 1.4 mM (Figura 29). Tras la adición de BSA la actividad aumentó notablemente ($V_{max} = 449$ nmol/min/mg proteína, K_m 2.51 ± 1.8 mM). El hecho de que la BSA parece estimar la actividad ATPasa de RimK sugiere que la proteína RimK puede ser bastante inestable y que la presencia del BSA ayuda a solubilizar la proteína (Figura 29). Por otro lado, la actividad no incrementó en presencia de la proteína RimB (Pf RimB ($V_{max} = 172$ nmol/min/mg proteína, K_m 0.86 mM) o Av RimB (V_{max} 136 nmol/min/mg proteína, K_m 0.50 mM), por el contrario, los ensayos sugieren que existe una reducción en la actividad de ATPasa de RimK.

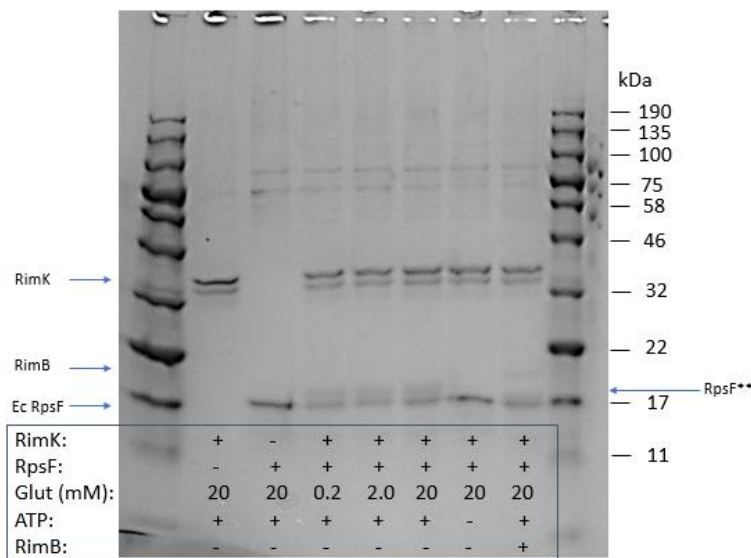


Figura 28. Caracterización bioquímica de la actividad glutamil-transferasa de RimK dependiente de ATP. El contenido de cada reacción se indica debajo de cada carril. Las posiciones de la proteína RimK (32.6 kDa), RimB (18.4 kDa), RpsF (17.3 kDa) y la forma glutamilada de RpsF (RpsF**) se encuentran marcadas con flechas. Se muestra un gel de acrilamida al 12.5% teñido con una mezcla coloidal de Coomassie.

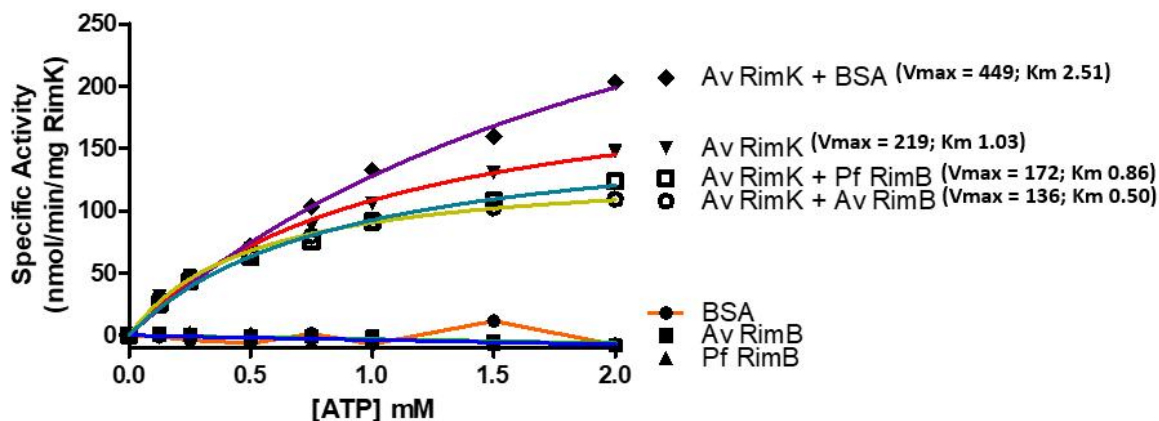


Figura 29. Caracterización de la actividad ATPasa de RimK de *A. vinelandii*. Se muestra la actividad específica en nmol ATP hidrolizados/min/mg de proteína de RimK de *A. vinelandii*, sola (▼) o en presencia de otros factores: BSA (◆); Pf RimB (■); Av RimB (●). Se incluyeron controles en ausencia de RimK (BSA, AvRimB, Pf RimB) los cuales no mostraron actividad.

2.3.3 El c-di-GMP y la actividad enzimática de RimK

Anteriormente Little y colaboradores (2016) demostraron que el segundo mensajero c-di-GMP juega un papel clave en la regulación de la actividad ribosomal, al mejorar la actividad de RimK en *P. fluorescens*; a través de estimular la actividad enzimática de ATPasa y glutamil-transferasa (Grenga et al., 2020; Little et al., 2016). Por tal razón, nos propusimos investigar si en *A. vinelandii* ocurre el mismo fenómeno. Para evaluar la interacción directa entre RimK y el c-di-GMP, realizamos un ensayo de “pull-down” utilizando c-di-GMP biotinilado y la proteína RimK de *A. vinelandii*. Como se puede apreciar en la Figura 30, la banda correspondiente a la proteína RimK se encuentra enriquecida en presencia de c-di-GMP, el mismo efecto se aprecia con la proteína BldD que utilizamos como control positivo de la reacción, BldD es un activador transcripcional de *Streptomyces coelicolor* que es capaz de unir c-di-GMP (Schumacher et al., 2017). Estos datos sugieren que al igual que en especies de *Pseudomonas*, el c-di-GMP juega un rol central en la modificación de la actividad ribosomal en *A. vinelandii*. Sin embargo, tenemos que realizar ensayos complementarios para lograr resultados concluyentes al respecto.

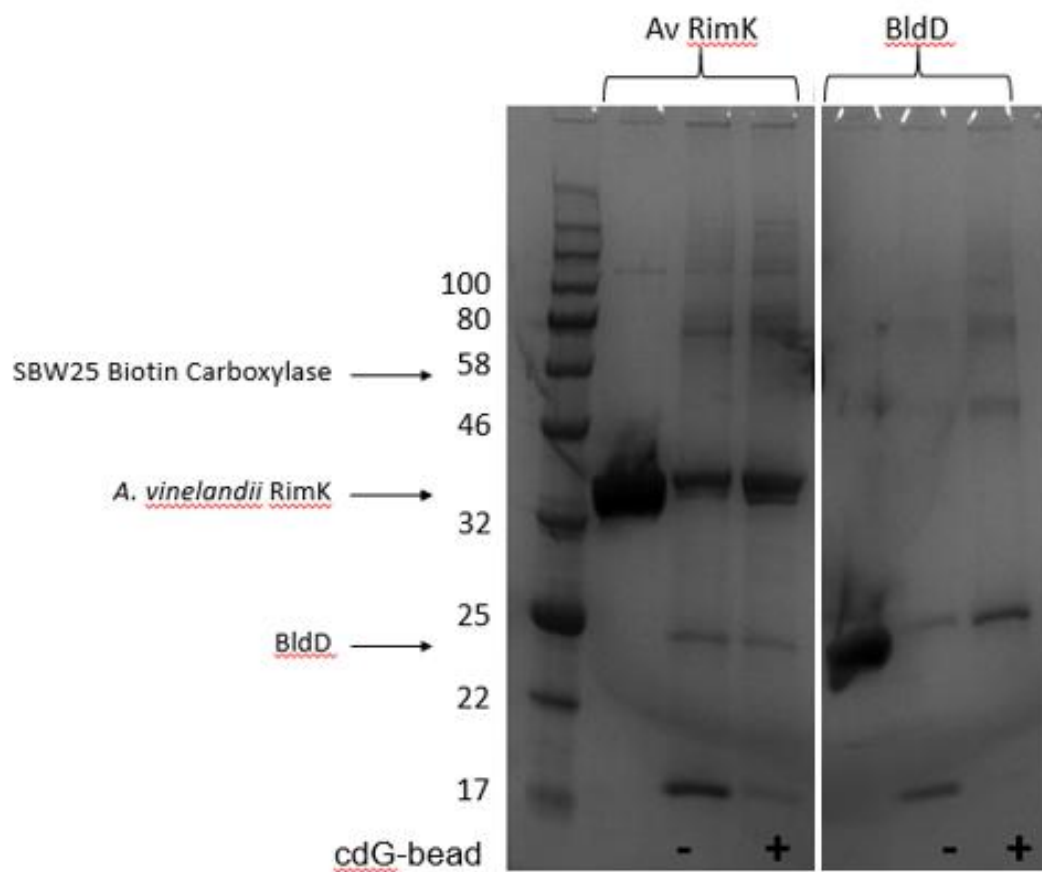


Figura 30. Unión del c-di-GMP a la proteína RimK. Ensayo de *pull-down* con c-di-GMP biotinilado y la proteína RimK de *A. vinelandii*. En presencia de c-di-GMP se enriquece la banda de RimK. Se incluyó como control positivo la proteína BldD de *S. coelicolor*.

2.3.4 Las proteínas RimK de *A. vinelandii* y *P. fluorescens* son funcionalmente intercambiables

RimK de *A. vinelandii* (Av) y *P. fluorescens* (Pf) comparten 90.8% de identidad. Dado que a nivel bioquímico los sistemas RimK/RpsF en estos dos géneros también están conservados, nos propusimos investigar si la función de las proteínas RimK podría ser de igual manera intercambiable. Para tal fin, se realizó una complementación heteróloga en la mutante $\Delta rimK/\Delta rimB$ de *P. fluorescens* con el gen *rimK*_{Av}. Es conocido que en ausencia de la proteína RimK *P. fluorescens* compromete su capacidad para colonizar la raíz de las plantas (Little et al., 2016). El proceso de colonización comienza con un fenómeno de quimiotaxis a lo largo de la rizósfera que sigue un gradiente de exudados, posteriormente la bacteria comienza a adherirse a la superficie, para dar lugar a la migración a través de la raíz y finalmente la formación de biopelículas (Chin-A-Woeng et al., 1997).

Para probar si la capacidad de colonización se restaura en la mutante $\Delta rimK/\Delta rimB$ de *P. fluorescens*, medimos de manera indirecta la producción de exopolisacáridos, componente principal de la matrix extracelular de la biopelícula, (recordemos que la biopelícula es el estado final en el que se da la colonización). Utilizando un ensayo de unión a rojo Congo (RC), colorante capaz de unirse a varios exopolisacáridos (Reichhardt et al., 2016).

Las cepas complementadas con los genes *rimK*_{Av} y *rimK*_{Pf} fueron crecidas en medio KB suplementadas con RC. Como se aprecia en la Figura 31A la complementación con cualquiera de los genes *rimK* (panel 3 y 4) incrementa la coloración en las colonias, lo que indica una mejora en la unión al CR, respecto a la mutante (panel 2) e incluso la producción de exopolisacáridos en las cepas que sobreexpresan los genes *rimK* (panel 3 y 4) aumentan en comparación con la cepa silvestre (panel 1).

Por otro lado, también realizamos la complementación heteróloga de la mutante $\Delta rimK$ de *A. vinelandii* con el gen $rimK_{Pf}$. Como se recordará, en la mutante $\Delta rimK$ se abate 100 veces la capacidad de formar quistes resistentes a la desecación. Como se observa en la Figura 31B, la complementación con el gen $rimK_{Pf}$ restablece la capacidad de enquistarse a niveles comparables a la cepa silvestre. En conjunto, estos resultados indican que ambos sistemas son funcionalmente intercambiables y que RimK es una proteína efectora de c-di-GMP.

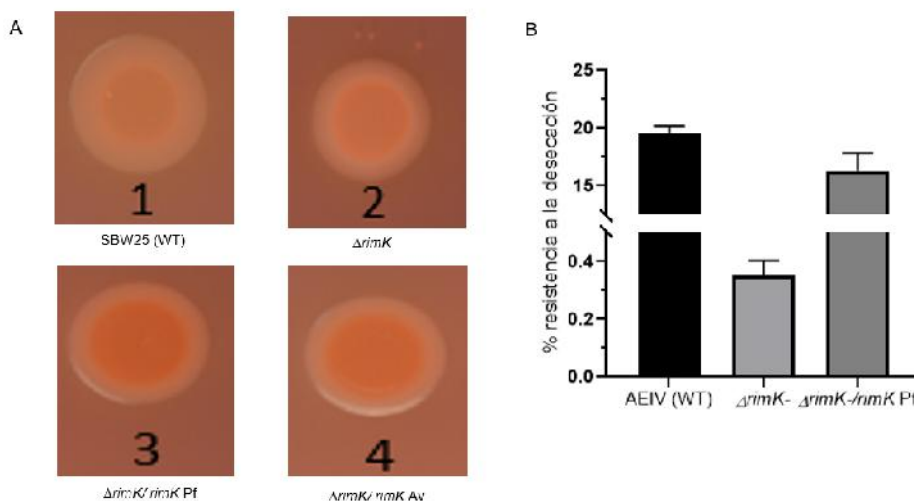


Figura 31. Complementación heteróloga de rimK en los sistemas de *P. fluorescens* y *A. vinelandii*. **A.** Ensayo de unión a rojo Congo: 1) cepa silvestre de *P. fluorescens* (Pf); 2) mutante $\Delta rimK/\Delta rimB$ (Pf); 3) cepa complementada con el gen $rimK_{Pf}$; 4) cepa complementada con el gen $rimK_{Av}$. **B.** Ensayo de enquistamiento en *A. vinelandii*. Se muestran las cepas silvestre (WT), mutante $rimK$ ($\Delta rimK$) y la complementada heterológamente con el gen $rimK_{Pf}$ ($\Delta rimK/rimK_{Pf}$).

2.3.5 RimB es una proteasa que modifica el C-terminal de RpsF

El sistema Rim en *P. fluorescens* está compuesto por la proteína RimA, una PDE activa que tiene la función de mejorar la actividad ATPasa de RimK; por RimK una glutamil transferasa que modifica el ribosoma y por RimB una proteasa con similitud a la clase Pfam PF05618 (proteasas dependientes de zinc). En *A. vinelandii* además de la proteína RimK también está presente la proteína RimB. Las proteínas RimB_{Av} y RimB_{Pf} se purificaron y para probar su posible actividad de proteasa fueron incubadas con la proteína RpsF C-mix (esta proteína está modificada con 10 residuos de glutamato añadidos en el C-terminal). Como se puede apreciar en la

Figura 32 la proteína RimB_{AV} es capaz de reducir la masa de RpsF C-mix lo que confirma su actividad de proteasa de la misma manera que se observa con la proteína RimB_{Pf}; además se puede apreciar como la actividad es más eficiente a mayor pH (Figura 32).

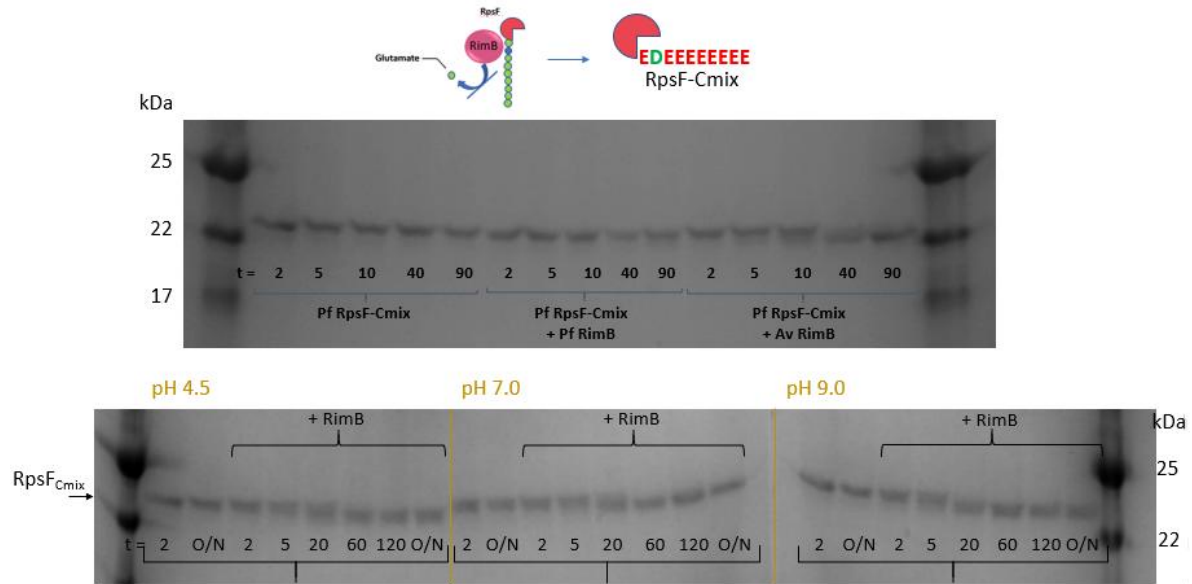


Figura 32. Caracterización enzimática de la proteína RimB de *A. vinelandii* como proteasa. Se muestra el desplazamiento de RpsF después de ser incubada con las proteínas RimB (Pf y Av) a diferentes tiempos (panel superior) o a distintos pHs (panel inferior). Se muestra un gel de acrilamida al 12.5% teñido con una mezcla coloidal de Coomassie.

2.4 Discusión

Las especies de *Pseudomonas* han desarrollado redes reguladoras complejas y dinámicas que involucran la afinación en la expresión de genes y proteínas que les permiten adecuarse al ambiente y economizar sus recursos. *A. vinelandii* es una *Pseudomonadacea* que habita el suelo (Sadoff, 1975), durante su diferenciación celular la bacteria sufre un recambio proteómico que permite la formación de quistes resistentes a la desecación (Chowdhury-Paul et al., 2018). En este estudio caracterizamos el sistema RimKB y demostramos la similitud que tiene respecto al sistema RimABK de *P. fluorescens*, un sistema de regulación que controla la adaptación de la bacteria en el ambiente rizosférico a través de la modificación de la actividad ribosomal (Grega et al., 2020). Nuestros resultados señalan que en *A. vinelandii* RimK es necesaria para el proceso de diferenciación celular, pues una mutante carente de este gen compromete significativamente su capacidad de producir quistes que resistan la desecación. Al igual que en *E. coli* y *P. fluorescens*, RimK tiene la actividad de glutamil-transferasa (Zhao et al., 2013) ya que es capaz de modificar *in-vitro* a la proteína ribosomal RpsF, lo que sugiere que RimK puede modificar la actividad ribosomal durante la diferenciación celular. En *P. fluorescens* la actividad de RimK además es modulada por el segundo mensajero c-di-GMP y la PDE RimA. A pesar de que en *A. vinelandii* no existe ortólogo a la PDE RimA, sabemos que el c-di-GMP juega un papel clave durante la formación de quistes tal y como se demuestra en el capítulo anterior, aunado a la evidencia de que RimK es capaz de unir c-di-GMP como se demuestra en el ensayo de *pull-down* de este estudio. Sin embargo, es necesario realizar análisis complementarios para establecer de manera concluyente la relación del c-di-GMP con el sistema Rim.

En *A. vinelandii* existen 27 posibles proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP; estas proteínas poseen dominios putativos con actividad de DGC, PDE o actividad dual (Ahumada-Manuel et al., 2020); es interesante investigar en un futuro cuáles son las DGC's a las que responde RimK y si la DGC caracterizada en el capítulo anterior, MucR, tiene relación con este sistema. Así mismo, sería importante identificar cuál es la PDE que suple la función de RimA. Por otro lado, también confirmamos la actividad de proteasa de RimB cuya participación regula la

actividad de RimK al limitar la cadena creciente de glutamato añadida a la proteína ribosomal RpsF. Finalmente, al demostrar que los sistemas son intercambiables entre ambas bacterias podemos suponer que los blancos de regulación también pueden ser similares. Al igual que en *P. fluorescens* en *A. vinelandii* RimK puede favorecer la producción de exopolisácaridos o de transportadores dependientes de ATP entre otros, que pudieran tener durante la diferenciación celular un rol esencial (Gimmestad et al., 2006; Hoidal et al., 2000; Steigedal et al., 2008). El establecimiento del regulón de RimK durante la diferenciación celular será clave para conocer los mecanismos moleculares involucrados en el control del proceso de enquistamiento por el sistema RimBK en *A. vinelandii*.

2.4 Conclusiones

1. La proteína RimK es esencial en el proceso de diferenciación celular en *A. vinelandii*.
2. RimK de *A. vinelandii* es una ATPasa capaz de añadir residuos de glutamato en el C-terminal de la proteína RpsF de *E. coli*.
3. RimK es capaz de unir c-di-GMP
4. RimB de *A. vinelandii* es una proteasa activa capaz de remover las colas de poli-glutamato del C-terminal de la proteína RpsF.
5. El sistema RimK/RimB de *A. vinelandii* se encuentra conservado y funciona de manera similar respecto al proceso de glutamilación y proteólisis de RpsF reportado en *P. fluorescens*.

3 REFERENCIAS

Aarstad, O. A., Stanisci, A., Sætrom, G. I., Tøndervik, A., Sletta, H., Aachmann, F.

L., & Skjåk-Bræk, G. (2019). Biosynthesis and function of long guluronic acid-blocks in alginate produced by *Azotobacter vinelandii*.

Biomacromolecules, 20(4), 1613–1622.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01796>

Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P., & van der Veen, S. (2011). Biofilm

formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in*

Biotechnology, 22(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.016>

Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaefer, V., Laub, M. T., Baker, T.

A., & Jenal, U. (2011). Regulatory cohesion of cell cycle and cell

differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Molecular Cell*, 43(4), 550–560.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.018>

Ahumada-Manuel, C. L., Martínez-Ortíz, I. C., Hsueh, B. Y., Guzmán, J., Waters,

C. M., 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. *Journal of Bacteriology*.

<https://doi.org/10.1128/JB.00134-20>

Ahumada-Manuel, C. L., 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*.

Applied Microbiology and Biotechnology, 101(4), 1521–1534.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7931-8>

Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-i](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-i)

Amikam, D., & Galperin, M. Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22(1), 3–6.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti739>

Arimura, Y., Kono, T., Kino, K., & Kurumizaka, H. (2018). Structural polymorphism of the *Escherichia coli* poly- α -L-glutamate synthetase RimK. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 74(7), 385–390. <https://doi.org/10.1107/S2053230X18007689>

Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R., & Harwood, C. S. (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 Research*, 40(15), 7207–7218.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks384>

Baraquet, C. & Harwood, C. S. (2016). FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 178–186. <https://doi.org/10.1128/JB.00539-15>

Barry, T., Geary, S., Hannify, S., MacGearailt, C., Shalloo, M., Heery, D., Gannon, F., & Powell, R. (1992). Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria.

Nucleic Acids Research, 20(18), 4940.

<https://doi.org/10.1093/nar/20.18.4940>

Berleman, J. E., & Bauer, C. E. (2004). Characterization of cyst cell formation in the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.

Microbiology, 150(2), 383–390. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26846-0>

Boyd, C. D., & O'Toole, G. A. (2012). Second messenger regulation of biofilm formation: Breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems.

Annual Review of Cell and Developmental Biology, 28, 439–462.

<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155705>

Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular basis of C(2+)-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*,

2(4), 1089–1096. <https://doi.org/10.1021/bm010008g>

Bush, M. J., Chandra, G., Findlay, K. C., & Buttner, M. J. (2017). Multi-layered inhibition of *Streptomyces* development: BldO is a dedicated repressor of

whiB: Inhibition of *Streptomyces* development. *Molecular Microbiology*,

104(5), 700–711. <https://doi.org/10.1111/mmi.13663>

Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer,

O., & Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 105(38), 14591–14596.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>

Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate

- production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183(23), 6787–6793. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001>
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17084–17089. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406134101>
- Chin-A-Woeng, T. F. C., de Priester, W., van der Bij, A. J., & Lugtenberg, B. J. J. (1997). Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 10(1), 79–86. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.79>
- Chou, S.-H., & Galperin, M. Y. (2016). Diversity of Cyclic Di-GMP-binding proteins and mechanisms. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 32–46. <https://doi.org/10.1128/JB.00333-15>
- Chowdhury-Paul, S., Pando-Robles, V., Jiménez-Jacinto, V., Segura, D., Espín, G., & Núñez, C. (2018). Proteomic analysis revealed proteins induced upon *Azotobacter vinelandii* encystment. *Journal of Proteomics*, 181, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.031>
- 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 (Reading, England)*, 160(Pt 3), 479–487. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>

- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 6), 1685–1693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046268-0>
- Cody, W. L., Pritchett, C. L., Jones, A. K., Carterson, A. J., Jackson, D., Frisk, A., Wolfgang, M. C., & Schurr, M. J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR controls cyanide production in an AlgZ-dependent manner. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 2993–3002. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-08>
- Curtis, P. D., & Brun, Y. V. (2010). Getting in the loop: Regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(1), 13–41. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-09>
- Dahlstrom, K. M., Giglio, K. M., Sondermann, H., & O'Toole, G. A. (2016). The inhibitory site of a diguanylate cyclase is a necessary element for interaction and signaling with an effector protein. *Journal of Bacteriology*, 198(11), 1595–1603. <https://doi.org/10.1128/JB.00090-16>
- den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K., & Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 78(2), 361–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07338.x>
- Dong, Q., & Bauer, C. E. (2015). Transcriptome analysis of cyst formation in *Rhodospirillum centenum* reveals large global changes in expression during cyst development. *BMC Genomics*, 16(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1250-9>

- Dow, J. M., Fouhy, Y., Lucey, J. F., & Ryan, R. P. (2006). The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1378–1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1378>
- Dubey, B. N., Agustoni, E., Böhm, R., Kaczmarczyk, A., Mangia, F., von Arx, C., Jenal, U., Hiller, S., Plaza-Menacho, I., & Schirmer, T. (2020). Hybrid histidine kinase activation by cyclic di-GMP-mediated domain liberation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2), 1000–1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911427117>
- Elliot, M. A., Bibb, M. J., Buttner, M. J., & Leskiw, B. K. (2001). BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 40(1), 257–269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02387.x>
- Ertesvåg, H. (2015). Alginate-modifying enzymes: Biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>
- Ertesvåg, H., Høidal, H. K., Hals, I. K., Rian, A., Doseeth, B., & Valla, S. (1995). A family of modular type mannuronan C-5-epimerase genes controls alginate structure in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 16(4), 719–731. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02433.x>
- Ertesvåg, H., Høidal, H. K., Schjerven, H., Svanem, B. I., & Valla, S. (1999). Mannuronan C-5-epimerases and their application for in vitro and in vivo design of new alginates useful in biotechnology. *Metabolic Engineering*, 1(3), 262–269. <https://doi.org/10.1006/mben.1999.0130>

- Ertesvåg, Helga, Sletta, H., Senneset, M., Sun, Y.-Q., Klinkenberg, G., Konradsen, T. A., Ellingsen, T. E., & Valla, S. (2017). Identification of genes affecting alginate biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by screening a transposon insertion library. *BMC Genomics*, *18*(1), 11.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3467-7>
- Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., Chu, X., & Gresshoff, P. M. (2019). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment*, *42*(1), 41–51.
<https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968>
- Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I., & Yao, M. (2013). The c-di-GMP recognition mechanism of the domain of bacterial cellulose synthase subunit A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *431*(4), 802–807.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.103>
- Gallagher, K. A., Schumacher, M. A., Bush, M. J., Bibb, M. J., Chandra, G., Holmes, N. A., Zeng, W., Henderson, M., Zhang, H., Findlay, K. C., Brennan, R. G., & Buttner, M. J. (2020). c-di-GMP arms an anti- σ to control progression of multicellular differentiation in *Streptomyces*. *Molecular Cell*, *77*(3), 586-599.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.006>
- Gimmestad, M., Steigedal, M., Ertesvag, H., Moreno, S., Christensen, B. E., Espin, 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(15), 5551–5560.
<https://doi.org/10.1128/JB.00236-06>
- Golden, J. W., & Yoon, H.-S. (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 557–563.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.004>
- Green, M. R., Sambrook, J., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Grenga, L., Little, R. H., Chandra, G., Woodcock, S. D., Saalbach, G., Morris, R. J., & Malone, J. G. (2020). Control of mRNA translation by dynamic ribosome modification. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008837.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008837>
- Grenga, L., Little, R. H., & Malone, J. G. (2017). Quick change: Post-transcriptional regulation in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(14).
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnx125>
- Ha, D.-G., & O'Toole, G. A. (2015). c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: A *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hay, I. D., Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2009). MucR, a Novel Membrane-Associated Regulator of Alginate Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*.

Applied and Environmental Microbiology, 75(4), 1110–1120.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02416-08>

Hay, Iain D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. A. (2013).

Microbial alginate production, modification and its applications: Bacterial alginates. *Microbial Biotechnology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>

Hay, I. D., Wang, Y., Moradali, M. F., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. A. (2014).

Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environmental Microbiology*, 16(10), 2997–3011. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12389>

Hecht, G. B., & Newton, A. (1995). Identification of a novel response regulator

required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6223–6229.

<https://doi.org/10.1128/jb.177.21.6223-6229.1995>

Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews*

Microbiology, 7(4), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>

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(1707), 20150498.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0498>

Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C.,

Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 8), 1953–1963.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>

- Hickman, J. W., & Harwood, C. S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69(2), 376–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x>
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Hinsa, S. M., & O'Toole, G. A. (2006). Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: A role for LapD. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 5), 1375–1383. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28696-0>
- Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 104(1), 492–498. <https://doi.org/10.1128/JB.104.1.492-498.1970>
- Hoidal, H. K., Svanem, B. I. G., Gimmetstad, M., & Valla, S. (2000). Mannuronan C-5 epimerases and cellular differentiation of *Azotobacter vinelandii*. *Environmental Microbiology*, 2(1), 27–38. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00074.x>
- Hoskisson, P. A., & Wezel, G. P. van. (2019). *Streptomyces coelicolor*. *Trends in Microbiology*, 27(5), 468–469. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.008>
- Huitema, E., Pritchard, S., Matteson, D., Radhakrishnan, S. K., & Viollier, P. H. (2006). Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell*, 124(5), 1025–1037. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.019>
- Jelsbak, L., & Søgaard-Andersen, L. (2002). Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 99(4), 2032–2037.

<https://doi.org/10.1073/pnas.042535699>

Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria.

Annual Review of Genetics, 40, 385–407.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090423>

Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: Second messenger

extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 271–284.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>

Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Congo red stain identifies matrix

overproduction and is an indirect measurement for c-di-GMP in many

species of bacteria. In K. Sauer (Ed.), *C-di-GMP Signaling: Methods and*

Protocols (pp. 147–156). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_12)

[1_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_12)

Jones, S. E., & Elliot, M. A. (2018). ‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces*

growth and development. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 25–30.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.009>

Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M.,

Roembke, B. T., & Sintim, H. O. (2013). Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP,

cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in

pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, 42(1), 305–341.

<https://doi.org/10.1039/c2cs35206k>

Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M., L., & Melton, T. (2005). Genus III

Azotobacter. In *Bergey’s Manual of systematic Bacteriology* (A. I. B. D.

1901, Noel NK, Staley JT, Garryty GM, pp. 384–402). Springer.

- Kino, K., Arai, T., & Arimura, Y. (2011). Poly- α -Glutamic Acid Synthesis Using a Novel Catalytic Activity of RimK from *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2019–2025.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02043-10>
- Kirillina, O., Fetherston, J. D., Bobrov, A. G., Abney, J., & Perry, R. D. (2004). HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Molecular Microbiology*, 54(1), 75–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04253.x>
- Knutson, C. A., & Jeanes, A. (1968). A new modification of the carbazole analysis: Application to heteropolysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 24(3), 470–481. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90154-1](https://doi.org/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 Research*, 43(17), 8268–8282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv747>
- Konovalova, A., Petters, T., & Sogaard-Andersen, L. (2010). Extracellular biology of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 89–106.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00194.x>
- Kossler, W., & Kleiner, V. (1986). Degradation of the nitrogenase proteins during encystment of *Azotobacter vinelandii*. 145, 287–289.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range

- cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Larsen, B., & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate. *Carbohydrate Research*, 17(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82536-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82536-7)
- Latoscha, A., Wörmann, M. E., & Tschowri, N. (2019). Nucleotide second messengers in *Streptomyces*. *Microbiology (Reading, England)*, 165(11), 1153–1165. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000846>
- Lawler, M. L., & Brun, Y. V. (2007). Advantages and mechanisms of polarity and cell shape determination in *Caulobacter crescentus*. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 630–637. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.007>
- 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(6), 1719–1728. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017665-0>
- Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K., & Frankenberg-Dinkel, N. (2013). NO-Induced Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by an MHYT Domain-Coupled Phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3531–3542. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-12>
- Li, Yi, Heine, S., Entian, M., Sauer, K., & Frankenberg-Dinkel, N. (2013). NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3531–3542. <https://doi.org/10.1128/JB.01156-12>
- Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D., & Shi, W. (2003). Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of

Myxococcus xanthus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5443–5448.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0836639100>

Liang, Z.-X. (2015). The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Natural Product Reports*, 32(5), 663–683. <https://doi.org/10.1039/C4NP00086B>

Lin, L. P., & Sadoff, H. L. (1968). Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of beta-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 95(6), 2336–2343. <https://doi.org/10.1128/JB.95.6.2336-2343.1968>

Little, A. S., Okkotsu, Y., Reinhart, A. A., Damron, F. H., Barbier, M., Barrett, B., Oglesby-Sherrouse, A. G., Goldberg, J. B., Cody, W. L., Schurr, M. J., Vasil, M. L., & Schurr, M. J. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Phosphorylation Status Differentially Regulates Pyocyanin and Pyoverdine Production. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02318-17>

Little, R. H., Grenga, L., Saalbach, G., Howat, A. M., Pfeilmeier, S., Trampari, E., & Malone, J. G. (2016). Adaptive Remodeling of the Bacterial Proteome by Specific Ribosomal Modification Regulates *Pseudomonas* Infection and Niche Colonisation. *PLOS Genetics*, 12(2), e1005837. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005837>

Liu, Y., & Li, J. (2008). Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media. *Environmental Science & Technology*, 42(2), 443–449. <https://doi.org/10.1021/es071861b>

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Ma, S., Selvaraj, U., Ohman, D. E., Quarless, R., Hassett, D. J., & Wozniak, D. J. (1998). Phosphorylation-independent activity of the response regulators AlgB and AlgR in promoting alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 956–968.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.4.956-968.1998>
- Martinez Ortiz, I. C. (2016). *Estudio de la proteína MucR en la síntesis de alginato en Azotobacter vinelandii*. tesis de licenciatura, Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Martínez-Flores, I., Pérez-Morales, D., Sánchez-Pérez, M., Paredes, C. C., Collado-Vides, J., Salgado, H., & Bustamante, V. H. (2016). In silico clustering of Salmonella global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Scientific Reports*, 6, 37858. <https://doi.org/10.1038/srep37858>
- Massie, J. P., Reynolds, E. L., Koestler, B. J., Cong, J.-P., Agostoni, M., & Waters, C. M. (2012). Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12746–12751.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1115663109>

- Matsuyama, B. Y., Krasteva, P. V., Baraquet, C., Harwood, C. S., Sondermann, H., & Navarro, M. V. A. S. (2016). Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(2), E209–E218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523148113>
- Mejía-Ruíz, H., Moreno, S., Guzmán, J., Nájera, R., León, R., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (2006). Isolation and characterization of an *Azotobacter vinelandii* algK mutant. *FEMS Microbiology Letters*, *156*(1), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12712.x>
- Merkel, T. J., Barros, C., & Stibitz, S. (1998). Characterization of the bvgR locus of *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology*, *180*(7), 1682–1690. <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1682-1690.1998>
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D., & Miller, S. I. (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: Mechanisms of signalling. *Cellular Microbiology*, *13*(8), 1122–1129. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01619.x>
- Moreno, J., Gonzalez-Lopez, J., & Vela, G. R. (1986). Survival of *Azotobacter* spp. In Dry Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(1), 123–125. <https://doi.org/10.1128/AEM.51.1.123-125.1986>
- Moreno, S., Ertesvåg, H., Valla, S., Núñez, C., Espin, G., & Cocotl-Yañez, M. (2018). RpoS controls the expression and the transport of the AlgE1-7 epimerases in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(19). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny210>

- Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (1998). Role of alternative sigma factor algU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *180*(10), 2766–2769.
- Moshiri, F., Kim, J. W., Fu, C., & Maier, R. J. (1994). The FeSII protein of *Azotobacter vinelandii* is not essential for aerobic nitrogen fixation, but confers significant protection to oxygen-mediated inactivation of nitrogenase in vitro and in vivo. *Molecular Microbiology*, *14*(1), 101–114.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01270.x>
- Munch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., & Jahn, D. (2005). Virtual Footprint and PRODORIC: An integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics*, *21*(22), 4187–4189.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti635>
- Murina, V., Kasari, M., Takada, H., Hinnu, M., Saha, C. K., Grimshaw, J. W., Seki, T., Reith, M., Putrinš, M., Tenson, T., Strahl, H., Hauryliuk, V., & Atkinson, G. C. (2019). ABCF ATPases involved in protein synthesis, ribosome assembly and antibiotic resistance: structural and functional diversification across the tree of Life. *Journal of Molecular Biology*, *431*(18), 3568–3590.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.013>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *64*(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/mubr.64.3.548-572.2000>
- Nikolskaya, A. N., & Galperin, M. Y. (2002). A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR

family. *Nucleic Acids Research*, 30(11), 2453–2459.

<https://doi.org/10.1093/nar/30.11.2453>

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(1), 141–148.

Okkotsu, Y., Tieku, P., Fitzsimmons, L. F., Churchill, M. E., & Schurr, M. J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* AlgR phosphorylation modulates rhamnolipid production and motility. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5499–5515.

<https://doi.org/10.1128/JB.00726-13>

Opoku-Temeng, C., & Sintim, H. O. (2017). Targeting c-di-GMP Signaling, Biofilm Formation, and Bacterial Motility with Small Molecules. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1657, 419–430.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_31

Ozaki, S., Schalch-Moser, A., Zumthor, L., Manfredi, P., Ebbensgaard, A., Schirmer, T., & Jenal, U. (2014). Activation and polar sequestration of PopA, a c-di-GMP effector protein involved in *Caulobacter crescentus* cell cycle control. *Molecular Microbiology*, 94(3), 580–594.

<https://doi.org/10.1111/mmi.12777>

Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., & Setlow, P. (2000). Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5505–5512. <https://doi.org/10.1128/jb.182.19.5505-5512.2000>

Petrova, O. E., & Sauer, K. (2009). A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens*, 5(11), e1000668. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000668>

- Petters, T., Zhang, X., Nesper, J., Treuner-Lange, A., Gomez-Santos, N., Hoppert, M., Jenal, U., & Sogaard-Andersen, L. (2012). The orphan histidine protein kinase SgmT is a c-di-GMP receptor and regulates composition of the extracellular matrix together with the orphan DNA binding response regulator DigR in *Myxococcus xanthus*. *Molecular Microbiology*, *84*(1), 147–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08015.x>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Reichhardt, C., McCrate, O. A., Zhou, X., Lee, J., Thongsomboon, W., & Cegelski, L. (2016). Influence of the amyloid dye Congo red on curli, cellulose, and the extracellular matrix in *E. coli* during growth and matrix purification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(27), 7709–7717. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9868-2>
- Remminghorst, U., & Rehm, B. H. A. (2006). In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 298–305. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.298-305.2006>
- Roelofs, K. G., Jones, C. J., Helman, S. R., Shang, X., Orr, M. W., Goodson, J. R., Galperin, M. Y., Yildiz, F. H., & Lee, V. T. (2015). Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with type II secretion systems. *PLoS Pathogens*, *11*(10), e1005232. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005232>

- Romling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1–52.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., & Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279–281.
<https://doi.org/10.1038/325279a0>
- Sadasivan, L., & Neyra, C. A. (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Exopolysaccharides and cyst formation. *Journal of Bacteriology*, 163(2), 716–723. <https://doi.org/10.1128/JB.163.2.716-723.1985>
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*, 39(4), 516.
- Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A., & Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4774–4781. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4774-4781.2005>
- Schumacher, M. A., Zeng, W., Findlay, K. C., Buttner, M. J., Brennan, R. G., & Tschowri, N. (2017). The *Streptomyces* master regulator BldD binds c-di-GMP sequentially to create a functional BldD2-(c-di-GMP)₄ complex. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6923–6933.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx287>

- Segura, D., Núñez, C., & Espín, G. (2020). *Azotobacter* Cysts. In John Wiley & Sons Ltd (Ed.), *ELS* (p. a0000295.pub2). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub3>
- Shimkets, L. J. (1986). Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. *Journal of Bacteriology*, *166*(3), 842–848.
<https://doi.org/10.1128/jb.166.3.842-848.1986>
- Skotnicka, D., Petters, T., Heering, J., Hoppert, M., Kaefer, V., & Søgaaard-Andersen, L. (2016). cyclic di-GMP regulates type IV Pilus-dependent motility in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, *198*(1), 77–90.
<https://doi.org/10.1128/JB.00281-15>
- Skotnicka, D., Smaldone, G. T., Petters, T., Trampari, E., Liang, J., Kaefer, V., Malone, J. G., Singer, M., & Søgaaard-Andersen, L. (2016). A minimal threshold of c-di-GMP is essential for fruiting body formation and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *PLOS Genetics*, *12*(5), e1006080.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006080>
- Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., & Kaefer, V. (2010). A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *Journal of Microbiological Methods*, *81*(3), 226–231.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.020>
- Steigedal, M., Sletta, H., Moreno, S., Mærk, M., Christensen, B. E., Bjerkan, T., Ellingsen, T. E., 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.

Environmental Microbiology, 10(7), 1760–1770.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01597.x>

Sudo, S. Z., & Dworkin, M. (1973). Comparative biology of prokaryotic resting cells.

Advances in Microbial Physiology, 9, 153–224.

[https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60378-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60378-1)

Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A. L., Volman, G., Mayer, R.,

Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., Cohen, A., Sapir, S., Ohana, P., &

Benziman, M. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic

di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of

conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4416–

4425. <https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4416-4425.1998>

Tschowri, N., Schumacher, M. A., Schlimpert, S., Chinnam, N. B., Findlay, K. C.,

Brennan, R. G., & Buttner, M. J. (2014). Tetrameric c-di-GMP mediates

effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces*

development. *Cell*, 158(5), 1136–1147.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.022>

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 Journal of Microbiology & Biotechnology*,

33(11), 198. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

Vela, G. R. (1974). Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied Microbiology*, 28(1),

77–79.

- Videau, P., & Cozy, L. M. (2019). *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Laboratory Maintenance, Cultivation, and Heterocyst Induction. *Current Protocols in Microbiology*, 52(1), e71. <https://doi.org/10.1002/cpmc.71>
- Walmsley, J., & Kennedy, C. (1991). Temperature-Dependent Regulation by Molybdenum and Vanadium of Expression of the Structural Genes Encoding Three Nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 622–624. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.2.622-624.1991>
- Wang, Y., Hay, I. D., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. A. (2015). Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7253–7265. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6591-4>
- Whitchurch, C. B., Alm, R. A., & Mattick, J. S. (1996). The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9839–9843. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9839>
- Whitney, J. C., Whitfield, G. B., Marmont, L. S., Yip, P., Neculai, A. M., Lobsanov, Y. D., Robinson, H., Ohman, D. E., & Howell, P. L. (2015). Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(20), 12451–12462. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645051>

Wyss, O., Neumnn, M. G., & Socolofsky, M. D. (1961). Development and germination of the *Azotobacter* cyst. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10, 555–565. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.555>

Zhao, G., Jin, Z., Wang, Y., Allewell, N. M., Tuchman, M., & Shi, D. (2013). Structure and function of *Escherichia coli* RimK, an ATP-grasp fold, L - glutamyl ligase enzyme: Structure of *E. coli* RimK. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(10), 1847–1854. <https://doi.org/10.1002/prot.24311>