

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



Papel del segundo mensajero c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000

TESIS DOCTORAL

Harold Alexis Prada Ramírez

2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Harold Alexis Prada Ramírez
D.L.: GR 2023-2014
ISBN: 978-84-9083-214-1

**Papel del Segundo Mensajero c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv.
tomato DC3000**

Memoria que presenta el licenciado en Biología y Microbiología,
Harold Alexis Prada Ramírez, para optar al título de Doctor

Fdo. **Harold Alexis Prada Ramírez**

VºBº

De los Directores de Tesis

Fdo: **María Trinidad Gallegos Fernández**
Doctora en Biología
Investigadora Científica del CSIC

Fdo: **Daniel Pérez Mendoza**
Doctor en Biología
Doctor contratado

Universidad de Granada
2014

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo Interacciones Planta-Bacteria perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), gracias a una beca de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al proyecto BFU2008-00086.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

Publicaciones

Pérez-Mendoza, D., Aragón, I., Prada-Ramírez, H., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T. y Sanjuan, J. (2014) Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE* **9**: e91645.

Vargas, P., Farias, G.A., Nogales, J., Prada, H., Carvajal, V. Barón, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A. y Gallegos, M.T. 2013. Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. *Environ. Microbiol. Reports* **5**: 841-850.

Congresos

Romero-Jiménez, L., Rodríguez, D., Prada-Ramírez, H., Gallegos, M.T., Sanjuán, J., y Pérez-Mendoza, D. Incorporación estable y expresión del gen de la diguanilato ciclasa PleD* en el genoma de bacterias que interactúan con plantas. II Iberoamerican conference on beneficial plant-microorganism-environment interactions (IBEMPA). Sevilla, España, septiembre 2013.

Prada-Ramírez, H.A., Pérez-Mendoza, D., Romero-Jiménez, L., Aragón, I.M., Ramos, C., Sanjuán, J. y Gallegos, M.T. Respuesta a elevados niveles de c-di-GMP en bacterias que interactúan con planta de manera simbiótica y patogénica. V Reunión Bianual del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología. Gerona, España, abril 2013.

Pérez-Mendoza, D., Prada, H., Romero-Gimeno, L., Salmond, G.P.C., Gallegos, M.T. y Sanjuán, J. Papel del c-di-GMP en las interacciones planta-bacteria. IV Reunión Bianual del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología. Tánger, Marruecos, febrero 2011.

El doctorando Harold Alexis Prada Ramírez y los directores de tesis María Trinidad Gallegos Fernández y Daniel Pérez Mendoza, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, junio de 2014.

María Trinidad Gallegos Fernández
Directora de Tesis

Daniel Pérez Mendoza
Codirector de Tesis

Fdo.:

Fdo.:

Harold Alexis Prada Ramírez
Doctorando

Fdo.:

“It always seems impossible until is done”

Nelson Mandela

A mis papás

A mi hermana

A Mafe

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han contribuido a que este trabajo se haya concluido de manera satisfactoria.

Así, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Mari Trini Gallegos Fernández, por haberme dado la oportunidad de incorporarme en su grupo de investigación y por brindarme toda su colaboración para que este trabajo llegara a buen puerto.

A mi codirector de tesis, el Dr. Daniel Pérez Mendoza por compartir todo su conocimiento científico, siempre aportándome ideas y comentarios enriquecedores.

Al Dr. Juan Sanjuán y al Dr. José Olivares por sus provechosos comentarios y discusiones científicas en los seminarios de grupo.

Al Dr. George Salmond y a la Dra. Kathryn Lilley por haberme recibido en sus laboratorios en la Universidad de Cambridge para realizar una estancia enriquecedora no solo a nivel científico sino también a nivel personal.

Al grupo del Dr. Rafael Rivilla de la Universidad Autónoma de Madrid y en especial a Fran por su colaboración para llevar a cabo los ensayos de ChIP-Seq.

A mis compañeras de grupo Vivian, Nieves, Lydia, Virginia, Lorena, Carol y David por todos esos buenos momentos que compartimos juntos. A Toñi por toda su colaboración en los ensayos en planta y por enseñarme a trabajar en el laboratorio de radioactividad. A Soco, Quina y María José Lorite por toda su colaboración en el laboratorio.

A mis compañeros de estancia en Cambridge, Nick, Ahmed, Nino, Renata, Carolina, Camilo y Miguel. Gracias por todo su apoyo y colaboración.

A Pao y Chema por su amistad, apoyo incondicional y por compartir tantas risas. Nunca olvidare mi primer día en España. Chicos muchas gracias.

A mi Papá por ser mi ejemplo a seguir en todo momento. A mi Mamá por ser esa voz motivadora y positiva que siempre me ilumina la vida. A mi hermanita por todo su apoyo y comprensión. Familia ustedes son lo más lindo y valioso que tengo.

A mi mujercita Mafe por brindarme su amor, apoyo, comprensión, amistad y ternura de una manera incondicional. De verdad muchas gracias por convertirme en un pilar en mi vida.

A todo el personal administrativo, limpieza, informático y de seguridad de la EEZ. En especial a mi amigo Pedro por compartir tertulias de fútbol en pro de nuestro amado Barcelona. De verdad muchas gracias por tu amabilidad y por tus risas.

Mil gracias a todos los arriba mencionados y a los que pase por alto ya que sin ustedes este trabajo no se hubiera culminado.

Resumen

Las bacterias fitopatógenas ejercen un control estricto de las funciones implicadas en la interacción con la planta, de modo que son capaces de pasar de un modo de vida libre, a otro más ventajoso en estrecha relación con su planta huésped (Camilli y Bassler, 2006; Jenal y Malone, 2006; Mills *et al.*, 2011). El c-di-GMP (diguanilato cíclico) es un segundo mensajero implicado en la regulación de numerosas funciones bacterianas, entre las que destacan muchas importantes para la interacción con eucariotas como la virulencia, motilidad, agregación, adhesión y formación de biopelículas (Jenal y Malone, 2006; Schirmer y Jenal, 2009; Tamayo *et al.*, 2007; Römling *et al.*, 2013). En concordancia, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, al igual que otras bacterias que interaccionan con plantas tanto patogénicas como simbióticas, presenta en su genoma una gran cantidad de genes que codifican proteínas potencialmente implicadas en la síntesis y degradación de este segundo mensajero. El alto número de proteínas relacionadas con el c-di-GMP, sugiere la existencia de una estricta regulación y una alta complejidad en la transducción de señales a través de este segundo mensajero de forma similar a lo descrito en otros modelos bacterianos más estudiados, como *Caulobacter crescentus*, que también modifican su estilo de vida dependiendo de las condiciones ambientales (Aldridge *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004). Sin embargo, esta aparente redundancia génica complica su estudio mediante aproximaciones clásicas de mutación de las diferentes diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDE), por lo que en este trabajo se realizó un doble abordaje: en primer lugar, se llevó a cabo un estudio *in silico* de las proteínas que hipotéticamente interaccionan con el c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y, en segundo lugar, se identificaron y caracterizaron algunas de ellas y se estudió si desarrollaban alguna función en la interacción de esta bacteria con la planta.

El trabajo *in silico* consistió en analizar las proteínas que interaccionan con el c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 comparándolas con las presentes en otras bacterias que interaccionan con plantas, tanto fitopatógenas (distintos patovares de *Pseudomonas syringae*) como simbióticas (diferentes géneros de rizobios), e incluso con otras bacterias del género *Pseudomonas*. Con objeto de hacer el estudio abordable, se llevó a cabo un análisis más detallado de dichas proteínas en las cepas modelo *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Sme), pero, en la medida de lo posible, el estudio comparativo se ha extendido a otros géneros y especies dentro de la familia Pseudomonadaceae y Rhizobiaceae con diferentes estilos de vida. De este modo, hemos logrado identificar dominios específicos de cepas patógenas y simbióticas, así como proteínas que podrían ser esenciales para un determinado estilo de vida o tipo de interacción con el hospedador.

La segunda aproximación al estudio del papel que desempeña el c-di-GMP en Pto, se realizó provocando un incremento generalizado de los niveles intracelulares de este segundo mensajero mediante la sobreexpresión de una DGC heteróloga de *C. crescentus* (PleD*, Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Dicho incremento fue corroborado por ensayos de cromatografía acoplados a espectroscopía de masas (HPLC-MS). Teniendo en cuenta la variedad de procesos celulares regulados por c-di-GMP, nos centramos en diversos fenotipos importantes en la interacción con el hospedador, como la morfología de colonia, la

Resumen

motilidad bacteriana, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelículas y la secreción proteica.

Al igual que se ha observado en otras bacterias, un incremento de los niveles de c-di-GMP en Pto produjo una disminución acusada de la motilidad, un cambio en la morfología de colonia en placas con Congo Red (colonias rojas y rugosas) y calcoflúor (mayor fluorescencia bajo luz ultravioleta) como consecuencia de un aumento en la producción de exopolisacáridos, una mayor formación de biopelículas en la interfase líquido-aire y una inducción en la secreción de ciertas proteínas periplásmicas. Sin embargo, aunque el incremento generalizado de los niveles intracelulares de c-di-GMP provocó una disminución de la expresión de ciertos determinantes de virulencia de Pto, como el sistema de secreción tipo III, no tuvo un impacto significativo sobre su patogenicidad en tomate, al menos bajo las condiciones ensayadas.

El fenotipo de colonia CR⁺/CF⁺ generado por el incremento en los niveles de c-di-GMP en Pto, nos permitió diseñar una estrategia de mutagénesis para encontrar genes implicados en la señalización de este segundo mensajero. Curiosamente, con esta aproximación se obtuvieron, tanto genes implicados en la pérdida del fenotipo (CR⁻/CF⁻) como en la exacerbación del mismo (CR⁺⁺/CF⁺⁺). Dentro de los genes identificados se encontraron varios que codificaban hipotéticos transportadores, reguladores transcripcionales (AmrZ), citocromos, una proteína con dominios GGDEF/EAL (MorA) y hasta tres proteínas diferentes implicadas en la síntesis o secreción de celulosa, que se caracterizaron fenotípicamente, tanto en vida libre como en asociación con su planta hospedadora.

La identificación de hasta nueve inserciones diferentes en el operón de la celulosa *wssABCDEFGHI*, dando todas ellas lugar a colonias blancas y lisas (CR⁻/CF⁻), puso de manifiesto la importancia de la regulación de la producción de la celulosa por c-di-GMP en esta bacteria. Además, la identificación de una inserción en un putativo regulador transcripcional (CR⁺⁺/CF⁺⁺) que se ha descrito como represor de diferentes EPS en otras bacterias (AmrZ), ha permitido descubrir un modo novedoso de regulación transcripcional del operón de síntesis de celulosa de Pto, donde también intervienen otros reguladores transcripcionales como FleQ.

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto la importancia que juega el c-di-GMP en bacterias que interactúan con plantas y, en particular, en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. En Pto, este segundo mensajero regula procesos como la producción de EPS, motilidad y formación de biopelículas que son clave en las fases iniciales de interacción con la planta hospedadora. Igualmente, este trabajo ha puesto de manifiesto otros posibles efectores cuya relación con el c-di-GMP es aún desconocida, abriendo un futuro interesante para el estudio de este segundo mensajero en esta bacteria modelo.

Índice

Agradecimientos.....	xiii
Resumen	xv
Índice	xvii
Abreviaturas	xxi
INTRODUCCIÓN	1
I. <i>Pseudomonas syringae</i>	3
1. Factores de virulencia.....	5
1.1. Producción de toxinas	5
1.2. El sistema de secreción tipo III.....	5
2. <i>P. syringae</i> pv. tomato	8
II. El c-di-GMP como segundo mensajero en bacterias.....	10
1. Biosíntesis y degradación del c-di-GMP	12
1.1. La diguanilato ciclasa PleD*	13
2. Efectores del c-di-GMP.....	15
2.1. Dominios PilZ	15
2.2. Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas con dominios degenerados.....	16
2.3. Reguladores transcripcionales y otras proteínas efectoras.....	17
2.4. <i>Riboswitches</i>	18
3. El c-di-GMP como molécula clave en la transición entre diferentes estilos de vida bacterianos.....	18
3.1. Motilidad bacteriana	19
3.2. Formación de biopelículas.....	23
3.3. Producción de exopolisacáridos.....	24
3.3.1. Alginato	25
3.3.2. Psl	26
3.3.3. Pel.....	27
3.3.4. Celulosa	29
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. Cepas y plásmidos.....	39
1.1. Cepas bacterianas.....	39
1.2. Plásmidos	39
1.2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo	39
1.2.2. Plásmidos construidos en este trabajo.....	40
2. Medios y condiciones de cultivo	44
2.1. Medios	44
2.1.1. Medios ricos	44
2.1.2. Medios mínimos	45
2.2. Antibióticos	45
2.3. Condiciones de cultivo.....	45
2.4. Conservación de los cultivos bacterianos.....	45
2.5. Transformación bacteriana	45
2.5.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	45
2.5.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	46
2.5.3. Preparación de células electrocompetentes	46
2.5.4. Electrotransformación	47
2.5.5. Selección de intercambio alélico y cointegración.....	47

3. Técnicas de manipulación de ADN	47
3.1. Aislamiento de ADN	47
3.1.1. Minipreparaciones de plásmidos	47
3.1.2. Aislamiento de ADN genómico	48
3.2. Electroforesis de ADN	48
3.2.1. Electroforesis en geles de agarosa	48
3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	48
3.2.3. Marcadores de peso molecular	49
3.3. Determinación de la concentración de ADN	49
3.4. PCR	50
3.4.1. PCR de colonia	50
3.5. Clonaje de fragmentos	50
3.5.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	50
3.5.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	50
3.5.3. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	51
3.5.4. Secuenciación y análisis de secuencias	51
4. Técnicas de manipulación de ARN	52
4.1. Aislamiento de ARN	52
4.2. Tratamiento con DNasa I	52
4.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total	53
4.4. PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)	53
4.5. Extensión reversa a partir de un cebador (<i>primer extension</i>)	54
4.5.1. Marcaje de cebadores	54
4.5.2. Hibridación y extensión reversa a partir de cebador	54
4.6. Cuantificación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (qRT-PCR) ..	55
4.6.1. Diseño de los oligonucleótidos	55
4.6.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN	55
4.6.3. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR) ..	55
4.6.4. Determinación de la eficiencia de los cebadores	56
4.6.5. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias	56
4.6.6. Cálculo de la expresión relativa	57
4.6.7. Oligonucleótidos utilizados para PCR cuantitativa	57
5. Análisis y purificación de proteínas	57
5.1. Preparación de muestras proteicas para análisis del secretoma	57
5.2. Sobreexpresión y purificación de proteínas	58
5.3. Determinación de la concentración de proteínas	58
5.4. Electroforesis de proteínas	59
5.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	59
5.4.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)	59
5.4.3. Geles bidimensionales	59
5.5. Detección de proteínas	60
5.5.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie	60
5.5.2. Tinción de proteínas con plata	60
5.5.3. Detección, cuantificación e identificación de proteínas en geles bidimensionales	60
5.6. Ensayos de retardo en gel (EMSA)	61
5.6.1. Obtención de la sonda	61
5.6.2. Marcaje de la sonda	62
5.6.3. Reacción de unión y electroforesis	62
5.7. Ensayos de inmunoprecipitación ChIP-seq	62
6. Mutagénesis con Tn5	63
6.1. Conjugación y selección de transconjugantes	63
6.2. Funcionalidad de PleD*	64
6.3. Mapeo de los mutantes	64

7. Ensayos <i>in vivo</i>	65
7.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos	65
7.1.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos con CR y CF.....	65
7.1.2. Cuantificación de la producción de celulosa en cultivos líquidos	65
7.2. Ensayos de motilidad bacteriana.....	65
7.2.1. Ensayos de <i>swimming</i>	65
7.2.2. Ensayos de <i>swarming</i>	66
7.3. Formación de biopelículas.....	66
7.4. Ensayos de infección en planta.....	66
7.4.1. Preparación del inóculo.....	66
7.4.2. Infección.....	67
8. Medición de los niveles de c-di-GMP.....	67
8.1. Extracción de c-di-GMP.....	67
8.2. Análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas.....	67
9. Ensayos de microscopía.....	68
CAPÍTULO I.....	69
Análisis <i>in silico</i> de proteínas que interactúan con el c-di-GMP en bacterias mutualistas y patogénicas de plantas.....	69
1. Identificación y clasificación de proteínas que interactúan con el c-di-GMP en bacterias mutualistas y patogénicas de plantas.....	71
1.1. Hipotéticas diguanilato ciclasas portadoras de dominios GGDEF.....	72
1.2. Hipotéticas fosfodiesterasas portadoras de dominios EAL	76
1.3. Hipotéticas fosfodiesterasas portadoras de dominios HD-GYP	78
1.4. Proteínas efectoras con dominios PilZ	79
2. Presencia de dominios adicionales asociados a dominios GGDEF y/o EAL.....	81
2.1. Proteínas con dominios GGDEF y EAL en tándem.....	82
2.2. Presencia de otros dominios	86
3. Implicaciones de las proteínas que interactúan con c-di-GMP en el estilo de vida de bacterias mutualistas y patogénicas de plantas.....	89
CAPÍTULO II.....	97
Importancia del segundo mensajero c-di-GMP en <i>P. syringae</i> pv. tomato	97
1. Incremento artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP.....	99
1.1. Sobreexpresión en Pto de la diguanilato ciclasa PleD* de <i>Caulobacter crescentus</i>	99
1.2. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP.....	99
2. Efecto de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en el estilo de vida libre de Pto.....	100
2.1. Efecto del c-di-GMP en motilidad	100
2.2. Efecto del c-di-GMP en la morfología de las colonias y en la producción de exopolisacáridos	102
2.3. Efecto del c-di-GMP en la formación de biopelículas	104
2.4. Efecto del c-di-GMP en el secretoma.....	105
3. Efecto de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en la interacción de Pto con su planta hospedadora	108
CAPÍTULO III.....	113
Identificación y caracterización de genes de <i>P. syringae</i> pv. tomato relacionados con el c-di-GMP e implicados en la interacción con la planta.....	113
1. Mutagénesis al azar de Pto con Tn5	115
1.1. Obtención de los mutantes.....	115
1.2. Mapeo de los mutantes obtenidos.....	116
1.2.1. Colonias CR ⁻	118
1.2.2. Colonias CR ⁺⁺	119

2. Caracterización de los mutantes Tn5 en vida libre.....	122
2.1. Motilidad.....	122
2.1.1. Motilidad tipo <i>swimming</i>	122
2.1.2. Motilidad tipo <i>swarming</i>	123
2.2. Producción de exopolisacáridos.....	124
2.3. Fenotipo en planta.....	126
2.3.1. Inoculación por infiltración.....	127
2.3.2. Inoculación por rociado.....	127
CAPÍTULO IV.....	131
Regulación de la síntesis de celulosa en Pto DC3000.....	131
1. Operón de síntesis de celulosa en Pto DC3000.....	133
1.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>wssABCDEFGHI</i>	133
1.2. Localización del punto de inicio de la transcripción del promotor del operón <i>wssABCDEFGHI</i>	133
2. Papel de AmrZ en la regulación de la síntesis de celulosa.....	135
2.1. Construcción de un mutante dirigido en <i>amrZ</i>	136
2.2. Caracterización del mutante Pto <i>amrZ</i>	136
2.2.1. Producción de exopolisacáridos.....	137
2.2.2. Motilidad.....	138
2.3. Papel de AmrZ en la regulación del operón de síntesis de celulosa.....	140
2.4. Cuantificación de los niveles de c-di-GMP en el mutante Pto <i>amrZ</i>	143
3. Papel de FleQ en la regulación de la síntesis de celulosa.....	144
3.1. Construcción de un mutante Pto <i>fleQ</i>	144
3.2. Caracterización del mutante Pto <i>fleQ</i>	145
3.2.1. Motilidad.....	145
3.2.2. Producción de exopolisacáridos.....	146
3.3. Papel de FleQ en la regulación del operón de síntesis de la celulosa.....	148
4. Papel de AmrZ y FleQ en la regulación de la síntesis de celulosa.....	151
4.1. Construcción del doble mutante Pto <i>amrZ/fleQ</i>	151
4.2. Caracterización del doble mutante.....	151
4.2.1. Efecto de AmrZ y FleQ en la expresión del operón <i>wss</i>	151
4.2.2. Efecto de AmrZ y FleQ en la producción de celulosa.....	152
4.3. Modelo de regulación de la producción de celulosa en Pto DC3000.....	152
DISCUSIÓN.....	157
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167
APÉNDICE.....	193

Abreviaturas

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AHL	N-acil-homoserina lactona
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosin trifostato
bv.	Biovariedad
BVA	<i>Biological variance analysis</i>
CCO	Complejo citocromo oxidasa
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
CEL	<i>Conserved effector locus</i>
CF	Calcoflúor
ChIP-seq	Chromatin inmunoprecipitation
Cm	Cloranfenicol
cm	Centímetros
CR	Congo Red
Ct	ciclo umbral
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGC	Diguanilato ciclasa
DIA	<i>Differences in gel analysis</i>
DMS	Dimetilsulfato
DMSO	Dimetil sulfoxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifostato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-inoculación
DTT	Di-tiotreitol
ECF	<i>Extracytoplasmic function</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEL	<i>Exchangeable effector locus</i>
EPS	Polisacáridos extracelulares (<i>exopolysaccharide</i>)
g	Gramos
g	Gravedades
Gm	Gentamicina
GMP	Guanosín monofostato
GT	Glucosiltransferasa
h	Horas
Hop	<i>Hrp outer protein</i>
HR	Respuesta de hipersensibilidad
Hrp	<i>Hypersensitive response and pathogenicity</i>
HTH	<i>Helix-turn-helix</i>
IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IMPAT	<i>Intein mediated purification with an affinity chitin binding tag</i>
InaZ	<i>Ice nucleation activity</i>
IPTG	1-isopropil- β -D-1 galactopiranosido
IPG	<i>Immobilized pH gradient gel</i>
IR	Secuencia repetida e invertida
JA	Ácido jasmónico
K_d	Constante de disociación
Kb	Kilo base

Abreviaturas

kDa	Kilo Dalton
Km	Kanamicina
kV	Kilo voltios
M	Molar
MCP	<i>Methyl-accepting protein</i>
MET	Microscopio electrónico de transmisión
MFP	Proteína de fusión periplásmica (<i>membrane fusion protein</i>)
min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMF	Medio mínimo inductor de T3SS
MMR	Medio mínimo de <i>Rhizobium</i>
MS	Espectrómetro de masas
Nal	Ácido nalidíxico
nM	Nanomolar
OMF	Porina de membrana externa (<i>outer membrane factor</i>)
ORF	Marco abierto de lectura (<i>open reading frame</i>)
PAI	<i>Pathogenicity island</i>
pb	pares de bases
PBS	Tampón fosfato
PCR	Reacción en cadena con ADN polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
pGpG	5' fosfoguanilil-guanosina
PNK	Polinucleótido quinasa
GTP	Guanosín trifosfato
Psy	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
pv.	Patovar
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
p/v	Peso/volumen
qRT-PCR	PCR para la cuantificación de la expresión génica relativa
QS	<i>Quorum sensing</i>
rdar	<i>red, dry and rough</i>
REC	<i>Signal receiver domain</i>
Rif	Rifampicina
RND	<i>Resistance, nodulation, cell division</i>
RSCV	<i>Rugose small-colony variants</i>
RT-PCR	PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel poliacrilamida en presencia de SDS
s	Segundos
SHMT	Serina hidroximetiltransferasa
Sme	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021
Pph	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Pto	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tm	Temperatura de fusión del ADN
TM	Transmembrana
TPR	<i>Tetratricopeptide repeat</i>
T1SS	Sistema de secreción tipo I

T2SS	Sistema de secreción tipo II
T3SS	Sistema de secreción tipo III
T6SS	Sistema de secreción tipo VI
UAS	<i>Upstream activation sequence</i>
ufc	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
v/v	Volumen/volumen
V	Voltios
WS	<i>Wrinkly spreader</i>
wt	Cepa silvestre (<i>wild type</i>)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
°C	Grados centígrados

INTRODUCCIÓN

I. *Pseudomonas syringae*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se clasifican filogenéticamente dentro del grupo γ -proteobacteria como bacilos Gram-negativos, quimiorganotrofos, aerobios y con flagelos generalmente polares (Palleroni, 1984; Silby *et al.*, 2011; Tümmler *et al.*, 2014). Son muy versátiles desde el punto de vista metabólico ya que pueden utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía, son capaces de colonizar diversos nichos ecológicos y se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente (Palleroni, 1984; Silby *et al.*, 2011; Tümmler *et al.*, 2014). Asimismo, en el género *Pseudomonas* hay cepas patógenas oportunistas de animales y humanos implicadas normalmente en infecciones nosocomiales, como *Pseudomonas aeruginosa*, hay cepas patógenas de plantas de importancia en agricultura, como *Pseudomonas syringae*, y cepas que estimulan el crecimiento de plantas y/o que son empleadas en procesos de biorremediación, como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (O'Brien *et al.*, 2011; Silby *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2013; Fazli *et al.*, 2014).

La primera *P. syringae* fue aislada en 1899 por M. W. Beijerinck de una planta de lila (*Syringa vulgaris*) que presentaba síntomas de enfermedad y posteriormente caracterizada y nombrada por C.J.J. van Hall. La especie *P. syringae* se divide en al menos 50 patovares que se distinguen genética y fenotípicamente por su patogenicidad y rango de hospedador. Sin embargo, los resultados de hibridaciones ADN-ADN y la secuenciación de genes esenciales han establecido la división de esta especie en al menos nueve genomoespecies diferentes (Gardan *et al.*, 1999; Sarkar y Guttman, 2004). Dentro de esta clasificación, *P. syringae* pv. tomato pertenece a la genomoespecie 3, denominada también "tomato".

Actualmente se dispone de la secuencia completa de los genomas de tres patovares de *P. syringae*: pv. phaseolicola (Pph) (Joardar *et al.*, 2005), pv. syringae (Psy) (Feil *et al.*, 2005) y pv. tomato (Pto) (Buell *et al.*, 2003), causantes de la grasa de la judía, el moteado de la judía y la mancha negra del tomate, respectivamente. Además, están parcialmente secuenciados y en proceso de ensamblaje los genomas de, al menos, 35 patovares (www.pseudomonas-syringae.org), cuyo análisis comparativo y funcional está permitiendo caracterizar, tanto los factores de virulencia conservados en *P. syringae*, como aquellos presentes únicamente en algunos patovares y que probablemente determinen la especificidad de hospedador (Baltrus *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2011).

Las bacterias pertenecientes a la especie *P. syringae* infectan una gran variedad de plantas, tanto herbáceas como leñosas, causando síntomas diversos, como moteados o necrosis en hojas, podredumbre de frutas, tumores o chancros en tallos, dependiendo del tipo de planta y del lugar de la infección (Hirano y Upper, 2000), pero también se encuentran habitualmente en el suelo, agua y en la superficie de las plantas. La filósfera es un ambiente adverso debido a los cambios rápidos y frecuentes de temperatura, humedad y radiación ultravioleta y a que la disponibilidad de nutrientes es limitada. Sin embargo, *P. syringae* se ha adaptado a esas condiciones gracias a diversos mecanismos. Por ejemplo, la tolerancia a radiación UV está mediada por el sistema RulAB y por otros sistemas de reparación del ADN (Sundin y Murillo, 1999; Kim y Sundin, 2000; Dulla *et al.*, 2005; Gunasekera y Sundin, 2006). En Pto DC3000, los *pili* tipo IV tienen un papel importante en el crecimiento epifítico y la tolerancia a radiación UV en la superficie de las hojas (Roine *et al.*, 1998). Por otro lado, las bombas de eflujo constituyen el principal mecanismo de

resistencia frente a compuestos antimicrobianos producidos por las plantas o por otros microorganismos presentes en esos hábitats y contribuyen a la supervivencia bacteriana en los tejidos vegetales (Osbourn, 1996; Dixon, 2001; Burse *et al.*, 2004a; 2004b; Vargas *et al.*, 2011). Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cutícula, la producción de compuestos surfactantes por las bacterias permite la solubilización y difusión de sustratos y facilita el movimiento de las mismas en la superficie de las hojas (Lindow y Brandl, 2003; Schreiber *et al.*, 2005; Burch *et al.*, 2012). En *P. syringae* pv. *syringae* se ha demostrado que la siringomicina, además de ser un importante factor de virulencia, es un potente tensoactivo que les permite modificar el microhábitat de la hoja (Lindow y Brandl, 2003).

La motilidad mediada por flagelos y la adherencia estable de las bacterias a la superficie de la hoja también son importantes en las primeras etapas de la colonización en algunos patovares de *P. syringae*. Así, se ha demostrado que mutantes con motilidad reducida o inmóviles están afectados en el crecimiento, supervivencia y/o competencia sobre la superficie de las hojas en comparación con las cepas móviles (Haefele y Lindow, 1987; Hattermann y Ries, 1989; Hirano y Upper, 2000; Ichinose *et al.*, 2003). Esto se debe a que los flagelos permiten a las bacterias localizar nutrientes, acceder a sitios protegidos del estrés ambiental, colonizar los tejidos vegetales y, posteriormente, dispersarse de nuevo en el medio ambiente (Ottemann y Miller, 1997; Melotto *et al.*, 2006). En algunas cepas de *P. syringae* la adhesión a la superficie de la hoja dependiente de *pili* tipo IV juega un papel importante en su supervivencia y en la colonización (Romantschuk *et al.*, 1993; Suoniemi *et al.*, 1995; Roine *et al.*, 1998).

La formación de agregados o microcolonias en las hojas permite a las bacterias modificar su entorno, incrementando sus posibilidades de supervivencia en la filósfera. Varios estudios han demostrado que *P. syringae* no se encuentra en la hoja como células aisladas sino formando agregados en los que el tamaño está directamente relacionado con la resistencia a la desecación (Monier y Lindow, 2003; 2004). En este sentido, algunas características de *P. syringae* son dependientes de la densidad celular (*quorum sensing*). Así, Quiñones *et al.* (2005) demostraron que el sistema AhII-AhIR y el regulador AefR estimulaban la producción de polisacáridos extracelulares (EPS, *exopolysaccharide*), la tolerancia al estrés oxidativo y la maceración del tejido vegetal. En *P. syringae* pv. *syringae*, el alginato es importante para la vida epifítica y como factor de virulencia, ya que protege a las bacterias de la desecación y de las especies reactivas de oxígeno, amortigua los cambios osmóticos y provoca lesiones acuosas en los tejidos (Yu *et al.*, 1999; Keith *et al.*, 2003; Quiñones *et al.*, 2005).

Por otra parte, las bacterias del grupo *P. syringae* han adaptado su metabolismo a la composición y condiciones del apoplasto vegetal siendo capaces de utilizar un número restringido de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Rico y Preston, 2008). La presencia de numerosos transportadores de tipo ABC, incluyendo aquellos involucrados en la captación de mono, disacáridos y aminoácidos, sugiere que son necesarios para acceder a nutrientes que pueden ser limitantes en esas condiciones, mejorando las capacidades adaptativas de la bacteria (Vorholt, 2012).

1. Factores de virulencia

P. syringae posee distintos factores de virulencia como el T3SS que altera y/o suprime las defensas de la planta hospedadora, lo que le permite multiplicarse en ella y obtener nutrientes a la vez que provoca los síntomas gracias también a la producción de toxinas (Abramovitch y Martin, 2004; Nomura *et al.*, 2005).

1.1. Producción de toxinas

P. syringae produce diferentes toxinas que contribuyen al proceso infeccioso actuando sobre distintas rutas metabólicas e induciendo clorosis y necrosis en los tejidos del hospedador (revisado en Bender *et al.*, 1999). Por ejemplo, la estructura anfipática de los lipopéptidos siringomicina y siringopeptina facilita su inserción en la bicapa lipídica de las membranas de las células vegetales y la formación de poros que incrementan la permeabilidad a los cationes y la pérdida del potencial de membrana, lo que conduce a la muerte celular y a la necrosis del tejido afectado (Hutchison y Gross, 1997; Bender *et al.*, 1999). Otras toxinas, como la faseolotoxina, la tabtoxina o la mangotoxina, inducen clorosis actuando sobre rutas metabólicas específicas del hospedador. La faseolotoxina inhibe la ornitina carbamoil transferasa, una enzima clave en el ciclo de la urea, la tabtoxina inhibe la glutamina sintetasa, esencial para la síntesis de glutamina y la eliminación de amonio, y la mangotoxina inhibe la ornitina acetiltransferasa, clave en la ruta biosintética de la ornitina y arginina (Arrebola *et al.*, 2009; Bender *et al.*, 1999). Recientemente, se han descrito otras toxinas pertenecientes al grupo de las siringofactinas que tienen actividad surfactante y son necesarias para la motilidad tipo *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Lindeberg *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). Determinadas fitotoxinas también pueden imitar la acción de las hormonas vegetales manipulando distintas rutas de señalización de la planta con el fin de contrarrestar las respuestas de defensa y acceder a nutrientes. Así, *P. syringae* pv. tomato produce coronatina, una toxina que interfiere la señalización mediada por el ácido jasmónico y promueve la apertura de los estomas facilitando la entrada de las bacterias, el crecimiento bacteriano en el apoplasto, la susceptibilidad sistémica y el desarrollo de síntomas, manifestados como clorosis (Bender *et al.*, 1999; Melotto *et al.*, 2006).

1.2. El sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (T3SS), denominado también sistema *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*), es el principal determinante de virulencia en *P. syringae*. Es una maquinaria de secreción especializada utilizada por numerosas bacterias Gram-negativas patógenas de plantas y animales que permite a la bacteria inyectar proteínas (efectores) directamente en el citoplasma de las células del hospedador o en el espacio intercelular (Alfano y Collmer, 2004). Una vez allí, los efectores provocan la enfermedad alterando y/o suprimiendo las respuestas de defensa a diferentes niveles, o desencadenan una respuesta inmune exitosa si son reconocidos por las proteínas de resistencia (Jones y Dangl, 2006).

El T3SS es una “jeringa molecular” que consiste en un aparato de translocación formado por dos anillos, uno interior en la membrana plasmática y otro exterior en la membrana externa, y un filamento denominado *pilus*, que sobresale de la célula (Figura 1). El *pilus* tipo III tiene un diámetro de 6-8 nm, su ensamblaje en la superficie de la célula depende del T3SS y funciona como un conducto para el transporte

Introducción

de los efectores a las células vegetales (Roine *et al.*, 1997; Hueck, 1998; Kubori *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000; Jin y He, 2001; Jin *et al.*, 2001). La proteína estructural del *pilus*, HrpA, muestra un alto grado de divergencia entre patovares que parece ser consecuencia de su localización extracelular y de la presión selectiva a la que está sometida para evadir los mecanismos de detección de cada planta (Roine *et al.*, 1997; Preston, 2000). Morfológicamente el *pilus* Hrp parece ser más largo y flexible que el de los patógenos animales, lo que probablemente es necesario para atravesar la gruesa pared celular de la célula vegetal (Ramos *et al.*, 2007; Büttner y He, 2009).

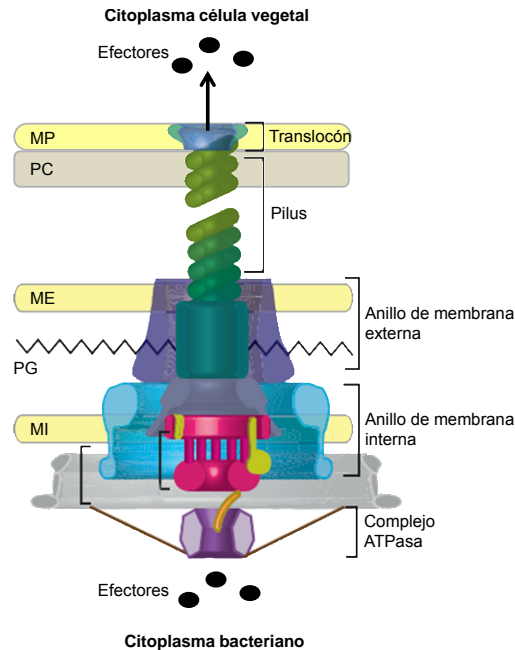


Figura 1. Representación esquemática del T3SS de una bacteria fitopatogena. El sistema de secreción, asociado a una ATPasa citoplasmática, atraviesa las dos membranas bacterianas y está conectado al *pilus* extracelular que sirve como canal de transporte de las proteínas secretadas (efectores). El translocón forma un canal proteico en la membrana citoplasmática de la célula vegetal, permitiendo la entrada de los efectores al citosol de la célula del hospedador. MI, membrana interna; PG, peptidoglicano; ME, membrana externa; PC, pared celular; MP, membrana plasmática. Modificado de Abrusci *et al.* (2014).

En *P. syringae* el T3SS está codificado en el cluster génico *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity / hrp conserved*), de aproximadamente 25 kb, que suele tener adyacentes genes que codifican efectores y se localiza en una isla de patogenicidad (PAI, *pathogenicity island*) (Figura 2; Alfano *et al.*, 2000). La región central conservada de la PAI Hrp incluye 7 operones, que contienen 26 genes que codifican el T3SS y sus reguladores. Las proteínas codificadas por los genes *hrc* son los componentes del sistema de secreción y forman el núcleo del cuerpo basal del aparato de secreción, que está localizado en la membrana celular bacteriana o en el citoplasma débilmente asociado con la membrana (Galán y Collmer, 1999; Alfano *et al.*, 2000). Ocho de las proteínas Hrc son muy similares en secuencia a los componentes del cuerpo basal flagelar y se localizan en la superficie de la membrana interna, formando un complejo similar al sistema de exportación de la flagelina (Figura 1; Alfano y Collmer, 1997; Tampakaki *et*

al., 2010). Las proteínas que se transportan a través del T3SS de *P. syringae* se denominan Hop (*Hrp outer protein*) y, entre estas, algunas se secretan en el espacio intercelular y funcionan como proteínas accesorias, mientras que otras, denominadas efectores, se secretan en el citoplasma de las células vegetales donde actúan (Alfano y Collmer, 2004).

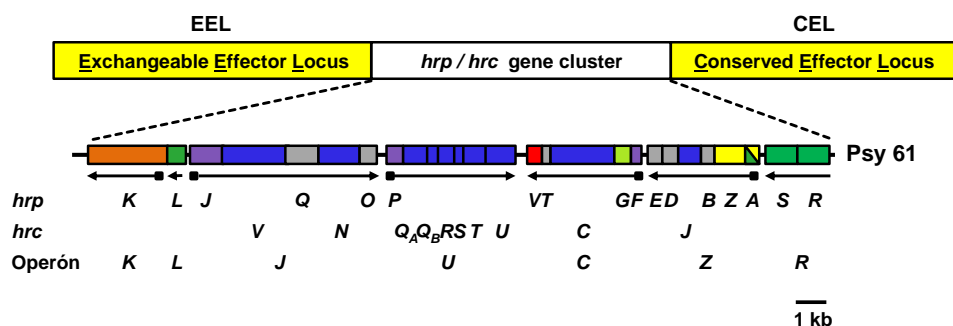


Figura 2. Organización genética de la isla de patogenicidad Hrp de *P. syringae*. La PAI Hrp se organiza en tres partes: la región central (genes *hrp/hrc*), que abarca aproximadamente 25 kb y está conservada en *P. syringae* pv. *syringae* 61, B728a y pv. *tomato* DC3000, contiene los genes que codifican para el T3SS y su regulación. Adyacentes se encuentran las regiones EEL (*exchangeable effector locus*) y CEL (*conserved effector locus*), que codifican proteínas que se secretan a través del T3SS. En la parte inferior de la figura se muestran los nombres de los genes y de los operones. Las flechas indican el sentido de la transcripción y los cuadrados la presencia de una caja *hrp* en los promotores dependientes de HrpL. Los otros genes codifican proteínas reguladoras (control positivo, verde y control negativo, rojo), los componentes Hrc asociados a la maquinaria del T3SS (azul), proteínas secretadas (amarillo), la proteína del translocón (naranja), proteínas reguladoras o que contribuyen a la secreción (violeta) y proteínas de función desconocida (gris). Las regiones EEL y CEL son de tamaño variable y no están representadas a escala. Modificado de Alfano *et al.* (2000).

Como se ha mencionado anteriormente, los genes que codifican los componentes del T3SS y algunos efectores están agrupados en la PAI Hrp, pero la mayoría de efectores están dispersos en el genoma o localizados en plásmidos (Alfano *et al.*, 2000; Buell *et al.*, 2003). A pesar de su diferente ubicación, la expresión de todos ellos está coordinada y sometida a un estricto control que responde a señales ambientales. Estos genes se expresan a niveles muy bajos en medios ricos en aminoácidos y se inducen tras el contacto con las células hospedadoras o en medios mínimos de composición definida que simulan las condiciones de la planta (Lindgren *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1992; 1994; Wei *et al.*, 2005). Un ejemplo es el medio mínimo inductor de *hrp* MMF, que posee una baja fuerza osmótica, un pH de aproximadamente 5,7 y azúcares simples, como la fructosa, como fuentes de carbono (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992; Hutcheson *et al.*, 2001).

La regulación del T3SS depende de HrpL, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa que pertenece a la familia ECF (*extracytoplasmic function*) (Xiao *et al.*, 1994; Xiao y Hutcheson, 1994; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2006). HrpL activa los genes del T3SS en respuesta a determinadas condiciones ambientales reconociendo una secuencia consenso denominada "caja *hrp*" situada en la región promotora de los genes que controla (Xiao y Hutcheson, 1994; Fouts *et al.*, 2002). La transcripción del gen *hrpL* es, a su vez, dependiente del factor sigma alternativo σ^{54} (RpoN) y de las

proteínas HrpR y HrpS, dos activadores transcripcionales (EBP, *enhancer binding protein*) pertenecientes a la familia de NtrC que se unen al promotor de *hrpL* como un heterodímero (Xiao *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 2000a; 2000b; Hutcheson *et al.*, 2001; Alarcón-Chaidez *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003). En *P. syringae* el mecanismo por el cual HrpR y HrpS regulan la transcripción de *hrpL* difiere entre cepas. En *P. syringae* pv. *syringae* 61 y pv. *tomato* DC3000, *hrpR* y *hrpS* se expresan como un operón a partir de un promotor situado por encima de *hrpR* (Xiao *et al.*, 1994; Hutcheson *et al.*, 2001). Además, la expresión del T3SS también se encuentra regulada postranscripcionalmente por el sistema de dos componentes GacS/GacA y a nivel postraduccional por HrpV, HrpG y la proteasa Lon (Preston *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000; Bretz *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2003; Losada y Hutcheson, 2005; Wei *et al.*, 2005; Tsilibaris *et al.*, 2006; Lan *et al.*, 2007; Ortiz-Martín *et al.*, 2010).

2. *P. syringae* pv. *tomato*

Pto es el agente causal de la mancha negra o moteado del tomate, una enfermedad que afecta distintas partes aéreas de la planta. En hojas de tomate, Pto provoca la formación de lesiones acuosas que con el tiempo se convierten en cloróticas acompañada de necrosis (Figura 3, Preston, 2000). En el fruto, las lesiones generalmente son pequeñas, con forma de lunar y superficiales (Figura 3). El desarrollo de esta enfermedad en la planta puede generar una clorosis generalizada, seguida de marchitamiento y, en casos severos, las plantas infectadas presentan retraso en la maduración del fruto y reducen su producción. Las bacterias pueden sobrevivir en el suelo, en restos de plantas enfermas y en semillas y se propagan en el agua de lluvia o de riego. Pto penetra en la planta a través de aberturas naturales (los estomas, principalmente) o heridas durante los períodos de alta humedad relativa, se multiplica en el espacio intercelular (apoplasto) y, con el tiempo, provoca los síntomas (Figura 4, Hirano y Upper, 2000; Xin *et al.*, 2013). La infección se ve favorecida por el clima fresco y húmedo, mientras que el progreso de la enfermedad se detiene en ambientes calurosos (Hirano y Upper, 2000; Preston, 2000).



Figura 3. Sintomatología causada por *P. syringae* pv. *tomato* en hojas y fruto de tomate. Se observan los síntomas característicos: puntos necróticos rodeados por halos cloróticos en hoja y lunares marrones/negros rodeados de un halo clorótico en fruto.

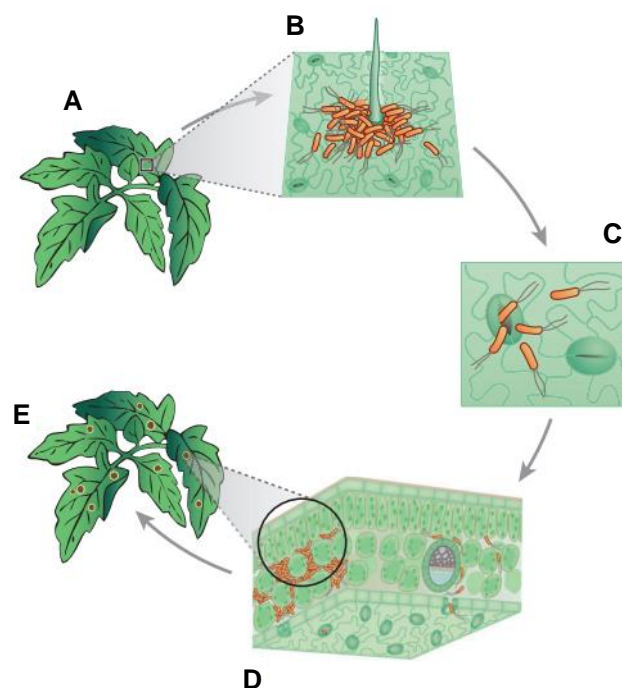


Figura 4. Proceso de infección de una planta por Pto. A. Hoja de una planta saludable. B. Bacterias en la superficie de la hoja formando agregados alrededor del tricoma. C. Bacterias entrando por los estomas. D. Colonización y multiplicación bacteriana en el apoplasto de la hoja. E. Síntomas de la enfermedad: clorosis y necrosis (Xin *et al.*, 2013; Melotto *et al.*, 2008).

P. syringae pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) es una cepa resistente a rifampicina derivada de *P. syringae* pv. tomato NCPPB1106 que se ha convertido en modelo para el estudio de los factores de virulencia bacterianos y de los mecanismos moleculares de la respuesta del hospedador frente a la infección. Infecta tomate y crucíferas y también la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Cuppels, 1986; Cuppels y Ainsworth, 1995). Además, provoca respuesta hipersensible (HR) en plantas no hospedadoras, como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana benthamiana* o judía (*Phaseolus vulgaris*) (Preston, 2000; Fouts *et al.*, 2003; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008).

El genoma de Pto DC3000 se compone de un cromosoma circular de 6.397.126 pb y dos plásmidos: pDC3000A (73.661 pb) y pDC3000B (67.473 pb), que en conjunto portan alrededor de 5.800 genes. El análisis comparativo de su genoma con el de otras especies de *Pseudomonas* ha permitido establecer que Pto tiene rutas metabólicas claves como glucólisis, gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs, pero es incapaz de convertir el piruvato en lactato ya que carece de la enzima lactato deshidrogenasa (Buell *et al.*, 2003). Además, Pto posee un amplio repertorio de transportadores para la adquisición de nutrientes, especialmente azúcares, y un número limitado de transportadores para aminoácidos en comparación con *P. putida* y *P. aeruginosa*. Aproximadamente el 12% de sus genes están implicados en regulación génica, transducción de señales y transcripción, lo que le permite adaptarse a diversas condiciones ambientales (Ullrich *et al.*, 1995; Bender *et al.*, 1999; Hutcheson *et al.*, 2001; Buell *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003). El genoma de Pto codifica también un gran número de proteínas

implicadas directa o indirectamente en virulencia, como aquellas relacionadas con motilidad, adhesión, T3SS, producción de toxinas, bloqueo de la respuesta inmune de la planta hospedadora, sistemas de captación de hierro o enzimas extracelulares, entre otras.

En Pto DC3000, el T3SS y la coronatina son los principales factores de virulencia. En su genoma alrededor de 40 genes, entre efectores y proteínas accesorias secretadas por el T3SS, tienen un papel en la translocación de proteínas a las células vegetales (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Alfano y Collmer, 2004; Lindeberg *et al.*, 2006). Curiosamente, algunos de ellos están en el plásmido pDC3000A, pero aún no se ha establecido el papel de los mismos en la virulencia de Pto, debido probablemente a que algunos de ellos tienen parálogos en el cromosoma (Buell *et al.*, 2003).

Pto produce coronatina, una toxina compuesta de ácido coronafácico y un derivado de isoleucina, el ácido coronámico. En DC3000 los genes implicados en la síntesis de los ácidos coronafácico y coronámico están codificados en el cromosoma y separados entre sí por 26 kb, a diferencia de lo que ocurre en otros patovares de *P. syringae* en los que esos genes están agrupados y codificados en plásmidos (Brooks *et al.*, 2004), y su expresión depende del factor sigma alternativo HrpL (Cuppels y Ainsworth, 1995; Fouts *et al.*, 2002). Además de su papel en la supresión de la defensa mediada por el ácido salicílico (Kloek *et al.*, 2001) y en la activación de la vía de señalización del ácido jasmónico (JA) gracias a su mimetismo con el mismo (Zhao *et al.*, 2003), la coronatina tiene un papel fundamental en la supresión de la defensa estomática (Melotto *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2007). Aunque en el genoma de Pto no se han identificado genes para la síntesis de otras fitotoxinas como siringomicina, siringotoxina o siringopeptina, se han encontrado 5 genes que codifican para péptido sintetasas no ribosomales. Uno de ellos, *syfA*, codifica un lipopéptido con actividad antibacteriana y necesario para la motilidad tipo *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Burch *et al.*, 2014).

Otros genes identificados en Pto DC3000 importantes para el crecimiento epifítico y colonización son los relacionados con la adhesión a superficies, como los de los *pili* tipo IV y la producción de exopolisacáridos (Roine *et al.*, 1998; Keith *et al.*, 2003). Asimismo, hay genes que codifican para posibles enzimas degradadoras de pared celular: pectina liasa, poligalacturonasa y otras con posible actividad celulolítica. Cabe destacar que DC3000 carece del gen que codifica para la proteína nucleadora de hielo (*InaZ*, *ice nucleation activity*), responsable de los daños por heladas en plantas infectadas y que sí se encuentra presente en otras cepas del grupo *P. syringae* (Lindow *et al.*, 1989; Buell *et al.*, 2003).

II. El c-di-GMP como segundo mensajero en bacterias

El permanente diálogo entre microbio y planta durante el establecimiento de una interacción conduce a la modificación del estilo de vida bacteriano, pasando de un modo de vida libre a una asociación íntima con su hospedador. Para generar una respuesta fisiológica rápida y acertada es necesario coordinar, en tiempo, espacio y bajo condiciones ambientales variables, la expresión de los determinantes bacterianos esenciales para la colonización e invasión de la planta, y esto se logra gracias a la transducción de todas esas señales mediante segundos mensajeros (Mole *et al.*, 2007). Las bacterias poseen un gran número de

sistemas de transducción de señales capaces de reconocer y responder a diversas señales ambientales y/o celulares (primera señal) alterando los niveles intracelulares de una segunda señal, conocida como segundo mensajero, de manera que la señal extracelular se puede propagar intracelularmente provocando respuestas fisiológicas específicas mediante la unión del segundo mensajero a diferentes moléculas efectoras (Camilli y Bassler, 2006; Hengge, 2009; Mills *et al.*, 2011; Podgornaia y Laub, 2013).

Químicamente los segundos mensajeros son moléculas de bajo peso molecular y alta solubilidad que difunden rápidamente en el interior de la célula aportando a los sistemas de transducción de señales varias ventajas: (1) proporcionan flexibilidad al integrar distintas señales ambientales, tanto de tipo físico como químico, en un sistema de transducción de señales común; (2) amplifican la señal original provocando respuestas celulares muy contundentes y (3) desencadenan una respuesta fisiológica rápida y eficaz al estar su síntesis y degradación modulada por actividad enzimática (Römling *et al.*, 2013). Existen numerosos tipos de segundos mensajeros (Ca^{+2} , cAMP, cGMP, varios tipos de fosfolípidos, inositol 1, 4, 5-trifosfato, etc.), entre los que destacan los estructuralmente basados en nucleótidos. A pesar de la diversidad de estos nucleótidos, de los organismos que los emplean y de los procesos regulados por ellos, toda la señalización de segundos mensajeros basados en nucleótidos posee unas características comunes: dos actividades enzimáticas distintas catalizan la síntesis y la degradación del segundo mensajero, que es capaz de unirse a una molécula efectora actuando como un regulador alostérico. A su vez, el efector interacciona con una molécula diana que interviene en la función regulada por el segundo mensajero. En bacterias, los segundos mensajeros basados en nucleótidos más estudiados son AMPc, (p)ppGpp y c-di-GMP (Pesavento y Hengge, 2009).

El bis-(3'-5')-cíclico di-guanosina monofosfato o diguanilato cíclico (c-di-GMP) fue descrito por primera vez por Benziman y colaboradores como un factor que activa alostéricamente la celulosa sintasa unida a membrana de *Gluconacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1987). El c-di-GMP se considera un segundo mensajero ubicuo en bacterias, clave en la regulación de la transición entre diferentes estilos de vida: libre y mótil *versus* sésil o en asociación formando biopelículas (Jenal y Malone, 2006). Para ello el c-di-GMP estimula la biosíntesis de adhesinas y diversos componentes de la matriz extracelular a la vez que inhibe diversas formas de motilidad (Jenal, 2004; Choy *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2006b; Hickman y Harwood, 2008; Zorraquino *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Además, el c-di-GMP controla la supervivencia a largo plazo y la respuesta a diversos estreses ambientales (Klebensberger *et al.*, 2007; Kumar y Chatterji, 2008; Sabirova *et al.*, 2008), la producción de antibióticos (Fineran *et al.*, 2007), regula la proteólisis y la progresión del ciclo celular (Duerig *et al.*, 2009), la virulencia de determinados patógenos (Dow *et al.*, 2006; Cotter y Stibitz, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2007) y otras funciones celulares. Estudios recientes también han demostrado que el c-di-GMP es un inmunomodulador eficaz y sugieren que este compuesto puede influir en la respuesta de células hospedadoras a patógenos bacterianos (Brouillette *et al.*, 2005; Karaolis *et al.*, 2007; Ogunniyi *et al.*, 2007; Römling *et al.*, 2013).

Tal vez, el aspecto más fascinante de la señalización del c-di-GMP está relacionado con su modo de actuación, ya que ejerce su control a múltiples niveles: transcripcional, postranscripcional y

postraduccional, uniéndose a diferentes tipos de efectores. Además, la amplia variedad de dominios en proteínas y ácidos nucleicos regulados por el c-di-GMP permite la existencia de una separación espacial, funcional y/o temporal en el proceso de señalización mediado por este segundo mensajero (Hengge, 2009; Römling *et al.*, 2013).

1. Biosíntesis y degradación del c-di-GMP

El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP gracias a la acción de diguanilato ciclasas (DGC) y se hidroliza a 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) o GMP por fosfodiesterasas específicas (PDE) (Jenal y Malone, 2006; Römling *et al.*, 2013). El pGpG es hidrolizado posteriormente en dos moléculas de GMP (Figura 5). La actividad DGC está asociada con el dominio GGDEF, que lleva el nombre de la secuencia de aminoácidos a la que se une el c-di-GMP, un motivo esencial en el centro activo de la enzima: GG[D/E]EF (Ausmees *et al.*, 2001). Algunas DGC pueden presentar una regulación adicional de su actividad mediante inhibición alostérica por la unión del c-di-GMP a un sitio inhibidor (sitio I, Jenal y Malone, 2006; Christen *et al.*, 2006; Wassmann *et al.*, 2007). Por otro lado, la actividad específica c-di-GMP PDE está asociada a dominios EAL o HD-GYP (Figura 5; Slater *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2008; Lovering *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013). Por tanto, los niveles intracelulares de este segundo mensajero se encuentran controlados por la actividad enzimática antagonista de DGC y PDE. Esto permite la manipulación artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de proteínas con estas actividades, lo que provoca una fuerte estimulación de la síntesis de las adhesinas y componentes de la matriz extracelular a la vez que inhibe la motilidad y la virulencia al sobreproducir proteínas con dominios GGDEF, mientras que la sobreexpresión de proteínas con dominios EAL generalmente ocasiona el fenotipo opuesto (Dow *et al.*, 2006; Jenal y Malone, 2006; Römling y Amikam, 2006; Ryan *et al.*, 2006b; Cotter y Stibitz, 2007; Ryan *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2007; Hengge, 2009; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).

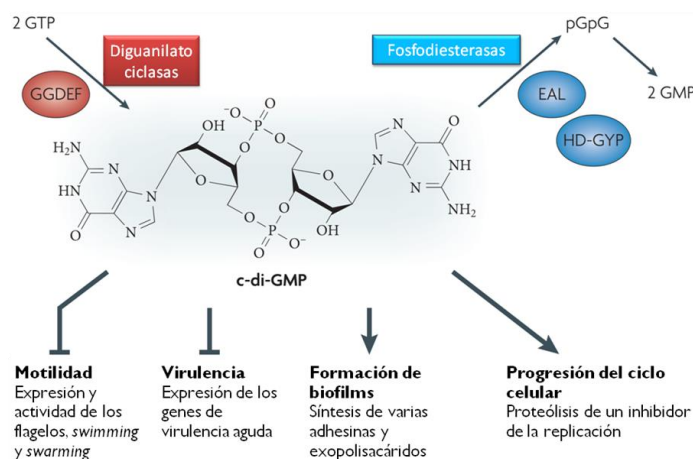


Figura 5. Estructura y funciones fisiológicas del c-di-GMP. El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP a través de los dominios GGDEF de las DGC. Los niveles de este segundo mensajero regulan de forma positiva la formación de biopelículas y progresión del ciclo celular y de manera negativa la expresión de genes de virulencia y motilidad. El c-di-GMP es hidrolizado por la actividad PDE de proteínas con dominios EAL y HD-GYP a pGpG y GMP, respectivamente. Modificado de Hengge (2009).

Pero existe una complicación adicional, ya que los análisis genómicos muestran que es bastante común que los motivos GGDEF y EAL se encuentren presentes a la vez formando parte de proteínas multidominio, de modo que aproximadamente 1/3 de todos los dominios GGDEF y 2/3 de todos los dominios EAL se encuentran en las mismas proteínas (Seshasayee *et al.*, 2010; Römling *et al.*, 2013; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/c-di-GMP.html). Este es un “enigma enzimático”, ya que una misma proteína contiene dos dominios con actividades enzimáticas opuestas. En el caso de que ambos dominios sean catalíticamente activos, parecen estar diferencialmente regulados por señales medioambientales y/o intracelulares de modo que, en un determinado momento, una actividad predomina. Esto es lo que ocurre en otras enzimas bifuncionales, como las histidín-quinasa/fosfatasa de los sistemas de dos componentes (Perego y Hoch, 1996) o las proteínas SpoT, que catalizan la síntesis y la degradación de la alarmona (p)ppGpp (Potrykus y Cashel, 2008). Hasta el momento solo se han caracterizado unas pocas proteínas GGDEF⁺/EAL⁺, aunque casi la mitad de las proteínas GGDEF/EAL parecen tener ambos sitios activos intactos (Tarutina *et al.*, 2006; Seshasayee *et al.*, 2010). Sin embargo, la situación más común es que uno de los dos dominios sea catalíticamente inactivo (Christen *et al.*, 2005). Pero estos dominios inactivos han evolucionado y realizan nuevas funciones que, en algunos casos, implican la unión (pero no el procesamiento) del sustrato, como, por ejemplo, la unión de GTP por los dominios GGDEF inactivos (Christen *et al.*, 2005) o la unión de c-di-GMP a dominios EAL inactivos (Navarro *et al.*, 2009; Kazmierczak *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2011).

La secuenciación a gran escala de los genomas bacterianos ha añadido otra pieza interesante en el puzzle de este segundo mensajero, ya que el número de proteínas bacterianas con dominios GGDEF y EAL codificadas en los genomas es muy variable. Unas pocas especies no tienen ninguna (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), la mayoría presentan un número intermedio (por ejemplo, *Escherichia coli* cuenta con 19 proteínas con dominios GGDEF y 17 con dominios EAL) y otras (*Vibrio vulnificus*) codifican hasta 100 de estas proteínas. Los estudios actuales están dirigidos a la caracterización genética y molecular de proteínas portadoras de dominios GGDEF, EAL y HD-GYP, lo que ha revelado la alta complejidad de los circuitos de regulación donde se encuentran integradas y puesto de manifiesto además interesantes conexiones de este segundo mensajero con otros sistemas regulatorios más conocidos y estudiados, como el de *quorum sensing* (QS) (Ueda y Wood, 2009; Römling *et al.*, 2013). Más aún, la mayoría de los dominios GGDEF y EAL están presentes en proteínas multidominio junto con otros dominios que participan en la detección de estímulos ambientales y/o en la transducción de señales, como PAS, HAMP, GAF y REC, lo que implica que muchas señales medioambientales e internas pueden ser integradas en la red de señalización del c-di-GMP (Galperin *et al.*, 2001a; De *et al.*, 2009; Schirmer y Jenal, 2009; Römling *et al.*, 2013).

1.1. La diguanilato ciclasa PleD*

La DGC PleD es el regulador de respuesta de un sistema de dos componentes involucrado en la diferenciación celular de *Caulobacter crescentus* (Aldridge *et al.*, 2003). Las células de esta bacteria son asimétricas, de modo que en un polo se localizan los *pili* tipo IV y un flagelo (Brun *et al.*, 1994; Figura 6).

La división celular genera dos células especializadas: una de vida libre (célula nadadora) y otra célula anclada a superficie a través del botón de anclaje (célula prostecada) (Figura 6, Brun *et al.*, 1994; Aldridge *et al.*, 2003). Este proceso tiene lugar tras la activación y localización de PleD en uno de los polos, lo que genera un gradiente de c-di-GMP en la célula que dirige el proceso de división y diferenciación morfológica de la bacteria (Figura 6, Aldridge *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2004).

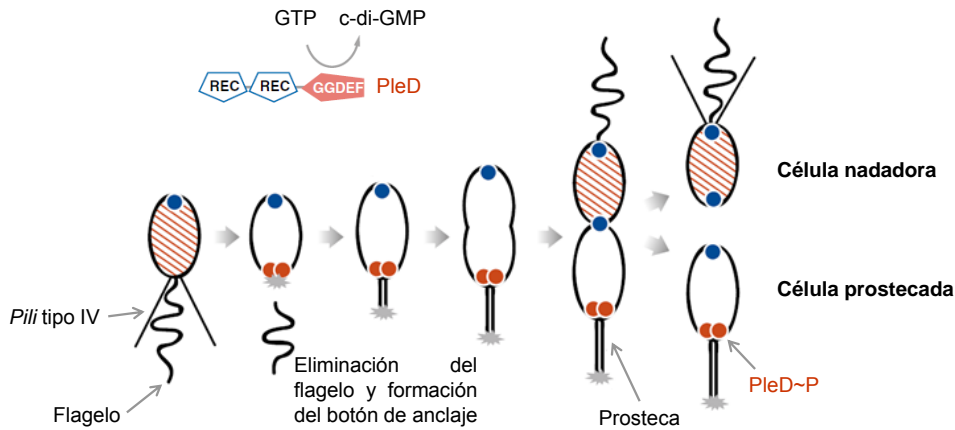


Figura 6. Representación esquemática de la diferenciación celular de *C. crescentus*. La célula nadadora debe diferenciarse a prostecada para poder dividirse. Es en este proceso cuando la proteína PleD es activada y movilizada al polo de la célula en diferenciación, donde controla la desaparición del flagelo y el desarrollo de la prosteca que anclará la célula a una superficie. Con la división celular se generan dos células especializadas: una célula nadadora, que porta un flagelo y *pili* tipo IV en uno de los polos, y otra prostecada. Modificado de Jenal y Malone (2006).

PleD presenta un sitio catalítico GGDEF y un sitio I de regulación alostérica negativa de la actividad DGC por unión del c-di-GMP (Figura 7; Chan *et al.*, 2004; Wassmann *et al.*, 2007). Este dominio catalítico, se encuentra asociado a dos dominios REC receptores de grupos fosfatos (REC1 y REC2) situados en el extremo N-terminal de la proteína. La fosforilación del Asp53 del dominio REC1 por la histidín-quinasa DivJ, genera cambios conformacionales que inducen la formación de dímeros enzimáticamente activos y su migración a uno de los polos celulares, controlando la desaparición del flagelo y el desarrollo de la prosteca que anclará la célula a una superficie (Aldridge *et al.*, 2003).

Se han obtenido mutantes en esta proteína que permiten la actividad DGC independiente de fosforilación y, por tanto, constitutiva. Este es el caso de la denominada PleD*, portadora de 4 mutaciones puntuales: una localizada en el dominio receptor REC1 (Asn120→Thr), dos localizadas en el dominio receptor REC2 (Ala214→Thr, His234→Pro), y otra localizada en el extremo C-terminal de la proteína (Tyr357→Asn) (Aldridge *et al.*, 2003). La clonación de dicho gen *pleD** en un plásmido bajo el promotor inducible P_{lac} ha permitido elevar de forma estable los niveles intracelulares de este segundo mensajero con independencia de su regulación por fosforilación en diferentes bacterias asociadas a plantas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011a; 2014).

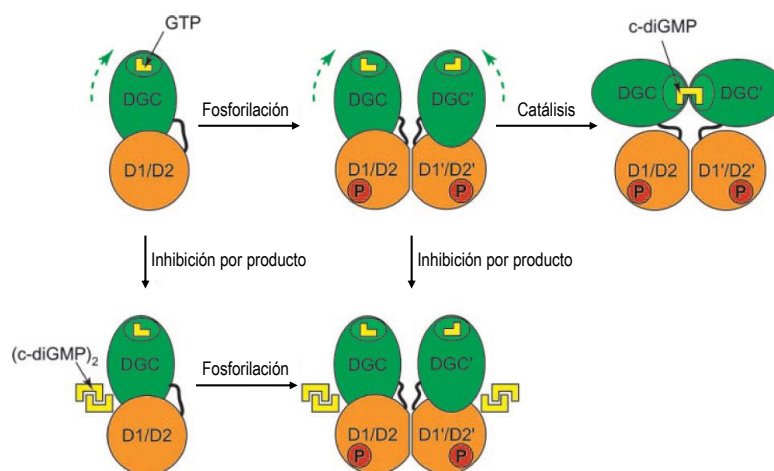


Figura 7. Regulación de la activación de la DGC PleD de *C. crescentus*. Esta proteína consta de un sitio catalítico en el extremo C-terminal (verde) y dos dominios receptores REC en el extremo N-terminal de la proteína (naranja, D1/D2 para REC1/REC2). PleD es activada mediante fosforilación del dominio REC1 por DivJ en el Asp53, lo que induce un cambio conformacional, la dimerización de la proteína y el acercamiento de las dos moléculas de GTP que van a ser cicladas ($2\text{GTP} \rightarrow \text{c-diGMP} + 2\text{PPi}$). El c-di-GMP se une al sitio I de la proteína bloqueando el cambio conformacional del dominio catalítico necesario para la ciclación, inhibiendo la actividad DGC. Modificado de Chan *et al.* (2004).

2. Efectores del c-di-GMP

La gran capacidad reguladora del c-di-GMP radica en la amplia diversidad de elementos efectores a los que este segundo mensajero se une de manera específica y en su actuación a distintos niveles: transcripcional, postranscripcional y postraduccionales (Monds *et al.*, 2007; Wolfe y Visick, 2008; Mills *et al.*, 2011; Zorraquino *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013). Hasta el momento se conocen 4 tipos de elementos efectores: los dominios PilZ, los motivos GGDEF y EAL degenerados, algunos reguladores transcripcionales y *riboswitches*, siendo el PilZ el mejor caracterizado (Amikam y Galperin, 2006; Ryjenkov *et al.*, 2006; Römling *et al.*, 2013). Sin embargo, la gran cantidad de funciones reguladas por el c-di-GMP y la presencia de numerosas DGC y PDE, contrasta con la baja presencia de moléculas efectoras en algunas bacterias, lo que apunta a la existencia de dominios efectores aún desconocidos. También hay que tener en cuenta que, al contrario de lo que sucede con las proteínas encargadas de la síntesis y degradación del c-di-GMP, la conservación de dominios específicos en las proteínas efectoras suele ser baja, lo que complica su identificación *in silico*.

2.1. Dominios PilZ

Los dominios PilZ fueron los primeros receptores de c-di-GMP identificados en bacterias. En primer lugar, se predijo su existencia en el componente glucosiltransferasa (BcsA) del complejo multienzimático de la celulosa sintasa de *G. xylinus* (Ross *et al.*, 1987; Amikam y Galperin, 2006). Tras la sobreexpresión y purificación de los dominios PilZ de la subunidad BcsA de *G. xylinus* y de la proteína YcgR de *E. coli*, se demostró que unían c-di-GMP (Ryjenkov *et al.*, 2006). Posteriormente, se identificaron otras proteínas con dominios PilZ (PlzC y PlzD en *Vibrio cholerae*, DgrA y DgrB en *C. crescentus*, PA4608 o Alg44 en *P.*

aeruginosa) que, tras unir de manera específica c-di-GMP, sufren cambios conformacionales que modulan su actividad y/o la de otras proteínas (Christen *et al.*, 2007; Merighi *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007; Ramelot *et al.*, 2007). Más recientemente se ha demostrado que la unión de c-di-GMP al dominio PilZ de BcsA induce la síntesis y secreción de celulosa a través de la membrana celular (Fujiwara *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2014). De hecho, la activación alostérica de la síntesis y/o secreción de distintos EPS por c-di-GMP parece ser una tónica general en bacterias, de modo que, además de celulosa, también activa la producción de alginato, N-acetil-glucosamina, Psl o Pel (Merighi *et al.*, 2007; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; Steiner *et al.*, 2013; Römling *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013). Igualmente, proteínas con dominios PilZ bien caracterizadas también están implicadas en motilidad, quimiotaxis o en la unión al ADN, por lo que parece claro que el dominio PilZ funciona como un módulo versátil regulando diversas actividades en función de los niveles de c-di-GMP. En ese sentido, los dominios PilZ se pueden encontrar independientes o asociados a otros dominios como glucosiltransferasas de tipo 2, reguladores de respuesta (REC), MCP, dominios de unión a ADN y dominios con actividad adenilato o guanilato ciclasa, entre otros (revisado en Römling *et al.*, 2013).

Por ejemplo, el efecto negativo de los altos niveles del c-di-GMP sobre la motilidad flagelar está mediado por proteínas con dominios PilZ, denominadas frenos moleculares o YcgR, las cuales se unen al motor del flagelo en complejo con el c-di-GMP, disminuyendo su frecuencia de rotación y, por tanto, la motilidad (Ryjenkov *et al.*, 2006; Boehm *et al.*, 2010; Armitage y Berry, 2010; Paul *et al.*, 2010). Otras proteínas portadoras de dominios PilZ regulan la síntesis de otros apéndices bacterianos, como *pili* o fimbrias, lo que afecta a la motilidad, la virulencia o la formación de biopelículas (Guzzo *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013). Otro ejemplo es el regulador transcripcional MrkH de *Klebsiella pneumoniae*, que se une c-di-GMP a través de su dominio PilZ e induce la transcripción del operón *mrk*, implicado en la producción de fimbrias tipo 3 (Johnson *et al.*, 2011; Wilksch *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

De manera similar a los dominios catalíticos que sintetizan o hidrolizan c-di-GMP, también se encuentran dominios PilZ activos e inactivos. Los dominios PilZ inactivos son incapaces de unir c-di-GMP debido a las modificaciones en su secuencia canónica y han adquirido otras funciones dependientes de interacciones proteína-proteína (Guzzo *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013). Irónicamente, la proteína denominada PilZ de distintas bacterias pertenece a esta categoría. Por ejemplo, en *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* la proteína PilZ aunque no une c-di-GMP, es necesaria para la motilidad tipo *twitching* a través de la interacción con FimX (GGDEF/EAL-) y PilB, una ATPasa necesaria para la polimerización del *pilus* tipo IV (Guzzo *et al.*, 2009; 2013). En *P. aeruginosa* la proteína PilZ (PA2960) también pertenece a esta categoría y se encuentra implicada en la biogénesis del *pilus* tipo IV, probablemente siguiendo un mecanismo molecular similar al descrito en *Xanthomonas* (Li *et al.*, 2009).

2.2. Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas con dominios degenerados

Tal y como se ha indicado anteriormente, en los genomas bacterianos no existe una correlación directa entre el número de proteínas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP (DGC y PDE) y el número proteínas con dominios PilZ que portan dichos genomas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_

Genomes/c-di-GMP.html), lo que sugiere la presencia de elementos efectores adicionales. Esta hipótesis se ha demostrado experimentalmente, ya que un mutante de *V. cholerae* que carece totalmente de dominios PilZ, sigue respondiendo a cambios en los niveles de c-di-GMP (Beyhan *et al.*, 2008).

En este sentido, se ha observado que los genomas bacterianos codifican un alto número de proteínas con dominios GGDEF y/o EAL degenerados que, aunque no son activos desde el punto de vista catalítico, pueden unir c-di-GMP u otros nucleótidos, por lo que ejercen como efectores. Por ejemplo, proteínas con motivos GGDEF degenerados que poseen un sitio de regulación alostérica activo (sitio I⁺) conservan la capacidad de unir c-di-GMP. Este es el caso de la proteína PopA, implicada en la progresión del ciclo celular de *C. crescentus*, que posee un dominio GGDEF degenerado (A⁻) y un sitio alostérico activo (I⁺). PopA se localiza en el polo de la célula y, tras la unión del c-di-GMP a su sitio I, dirige al regulador global del ciclo celular CtrA a esta localización donde será degradado por la proteasa ClpXP, permitiendo la progresión del ciclo celular de esta bacteria (Duerig *et al.*, 2009; Abel *et al.*, 2011).

Asimismo, algunos sitios GGDEF degenerados (sitios A⁻) pueden unir GTP, sirviendo quizás como sensores del estado energético de la célula (Christen *et al.*, 2005; Kuchma *et al.*, 2007). Del mismo modo, ciertos dominios EAL degenerados, que carecen de actividad PDE, conservan la capacidad de unir c-di-GMP (Kuchma *et al.*, 2007; Guzzo *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2009). Así, la proteína LapD de *P. fluorescens* Pf0-1 contiene dominios GGDEF y EAL enzimáticamente inactivos, pero une c-di-GMP en el motivo EAL degenerado, lo que activa la secreción de la adhesina LapA (Newell *et al.*, 2009). Otro ejemplo de proteínas híbridas que presentan los dominios GGDEF y EAL degenerados es FimX de *P. aeruginosa*, que participa en la motilidad tipo *twitching* mediada por *pili* tipo IV. El dominio EAL degenerado y enzimáticamente inactivo de FimX sirve como un receptor de alta afinidad de c-di-GMP (Kazmierczak *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011).

2.3. Reguladores transcripcionales y otras proteínas efectoras

En los últimos años, se han descrito una gran cantidad de proteínas que unen c-di-GMP pero no pertenecen a los tipos ya establecidos, por lo que, en la mayoría de los casos, sus dominios de unión no están identificados. La primera proteína de este tipo que se caracterizó fue FleQ de *P. aeruginosa* que, además de ser el regulador maestro de la biogénesis flagelar, regula positivamente la expresión de varios operones implicados en la síntesis de EPS tras unir de manera específica c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012). Recientemente, se ha demostrado que la unión del c-di-GMP a FleQ también inhibe competitivamente su actividad ATPasa, provocando una disminución en la expresión de los genes flagelares (Baraquet *et al.*, 2013). Pero FleQ no es el único miembro de la familia de activadores σ^{54} que une c-di-GMP, VpsR de *V. cholerae* también es un receptor de c-di-GMP y, unido a este segundo mensajero, induce la transcripción de *aphA* y de *vpsT*, que codifican el regulador central de la cascada de la virulencia y de QS y el activador de la formación de biopelículas, respectivamente (Srivastava *et al.*, 2011). En *Xanthomonas* y *Burkholderia* se han descrito reguladores transcripcionales de tipo CRP/FNR que unen c-di-GMP, como Clp o Bcam1349 (Chin *et al.*, 2009; Fazli *et al.*, 2011; Leduc y Roberts, 2009). Concretamente, Clp activa la expresión de varios genes implicados en virulencia en *X. campestris* y el c-di-

GMP inhibe esa expresión, ya que, al unirse a Clp con alta afinidad, provoca su disociación de los promotores que regula (Chin *et al.*, 2009). Además de los reguladores transcripcionales mencionados, recientemente se ha descrito una hipotética oxidoreductasa de cadena corta con capacidad para unirse al c-di-GMP, aunque con baja afinidad (Ma *et al.*, 2011).

En definitiva, estos descubrimientos ayudan a aclarar lo que se consideraba una contradicción, ya que parecía que las bacterias tenían muchas más enzimas implicadas en la síntesis y en la degradación del c-di-GMP que proteínas implicadas en la respuesta a este segundo mensajero. Además, la puesta a punto de nuevas aproximaciones metodológicas para la identificación a gran escala de nuevos elementos efectores, permitirá una expansión de este campo en un futuro próximo (Roelofs *et al.*, 2011; Düvel *et al.*, 2012; Nesper *et al.*, 2012).

2.4. Riboswitches

Los *riboswitches* son otro tipo de efectores que regulan un amplio número de procesos celulares, incluyendo la expresión de genes asociados a virulencia, formación de *pili* o biosíntesis de flagelos. Estructuralmente son segmentos no codificantes de ARNm que adoptan estructuras secundarias específicas y unen moléculas pequeñas. La unión del ligando provoca un cambio conformacional de esas estructuras secundarias, alterando la transcripción, la estabilidad del ARNm o la traducción de los genes codificados más abajo (Barrick y Breaker, 2007).

Recientemente se han identificado *riboswitches* que responden de manera específica y muy sensible (K_d en el rango nM) al c-di-GMP regulando la expresión génica positiva o negativamente (Sudarsan *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). Hasta el momento, se distinguen dos clases de *riboswitches* dependientes de c-di-GMP. Los *riboswitches* de tipo I están presentes en varias especies de Proteobacteria y Firmicutes y también se denominan GEMM, ya que se habían identificado previamente pero se desconocía su ligando (Lee *et al.*, 2010). Los *riboswitches* de tipo II presentan una distribución más restringida encontrándose sobre todo en *Chloroflexi* y *Clostridia*. Los genes regulados por estos *riboswitches* parecen estar implicados en funciones relacionadas con la formación de biopelículas, como la síntesis y la degradación de c-di-GMP, la motilidad, la síntesis de *pili* o la regulación de la transcripción, pero también en la síntesis de péptidos no ribosomales. Incluso, algunos representantes de esta clase están implicados en *splicing* de RNA inducido por c-di-GMP y muchos otros genes codifican proteínas con funciones aún desconocidas (Sudarsan *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Weinberg *et al.*, 2007). De hecho, es probable que se descubran nuevos procesos controlados por el c-di-GMP cuando se avance en la investigación de los *riboswitches* dependientes de este segundo mensajero.

3. El c-di-GMP como molécula clave en la transición entre diferentes estilos de vida bacterianos

Para sobrevivir en el medio natural, las bacterias deben regular de manera precisa y rápida los mecanismos que les permiten adaptarse a los continuos cambios ambientales. De este modo, las

bacterias pueden vivir como células individuales móviles o como parte de una comunidad sésil y/o en asociación con un organismo superior. Estos dos estilos de vida otorgan a las bacterias distintas ventajas adaptativas: por una parte, la motilidad les permite colonizar nuevos nichos ecológicos en busca de una mayor disponibilidad de nutrientes, mientras que en las biopelículas están más protegidas frente a condiciones adversas, como la radiación ultravioleta o la depredación (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Branda *et al.*, 2005; Jarrell y McBride, 2008). Por tanto, la habilidad de la bacteria para adoptar uno de estos dos estilos de vida en condiciones ambientales específicas es crucial para su supervivencia y, por eso, la regulación génica dependiente de señales ambientales que conduce a la formación de biopelículas o desencadena que la bacteria opte por un modo de vida libre, es muy compleja.

En numerosas bacterias, como *C. crescentus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli* o *G. xylinus*, el c-di-GMP es una molécula clave en la regulación de la transición de un estilo de vida libre a otro vida sésil asociado a la formación de biopelículas, ya que estimula la biosíntesis de adhesinas, EPS y otros componentes de la matriz extracelular e inhibe distintas formas de motilidad. Por el contrario, es preciso que disminuyan los niveles intracelulares de c-di-GMP durante la maduración y la dispersión de las biopelículas. A su vez, el flagelo es importante no solo para la dispersión y colonización de nuevos nichos ecológicos, sino que también contribuye a la adhesión inicial a superficies, al desarrollo y a la maduración de las biopelículas, dejando patente que estos dos estilos de vida están íntimamente relacionados (O'Toole *et al.*, 1998a; 1998b; Römling *et al.*, 2013).

Este segundo mensajero regula igualmente la transición entre otros estilos de vida bacterianos. Por ejemplo, en *P. aeruginosa* controla el paso de un estado de infección crónico, asociado a la formación de biopelículas, a un estado de infección agudo, asociado a distintos tipos de motilidad y a la expresión de factores de virulencia (Moscoso *et al.*, 2011). A su vez, la transición de un estilo de vida móvil a uno sésil en *C. crescentus* es dependiente del c-di-GMP y está acompañado de una diferenciación celular muy particular en la que se originan dos células especializadas (Aldridge *et al.*, 2003; ver apartado II.1.1).

3.1. Motilidad bacteriana

La motilidad es muy importante para las bacterias, ya que les permite dirigirse hacia entornos favorables y escapar de condiciones adversas, incrementando su competitividad en el ambiente. Está implicada en varios procesos, como las respuestas tácticas (quimiotaxis, aerotaxis, etc), la colonización de los hospedadores, la formación de biopelículas y su dispersión. El flagelo es el orgánulo que propulsa a las bacterias en medios líquidos (motilidad tipo *swimming*) y sobre superficies o a través de ambientes viscosos (motilidad tipo *swarming*). Además, los flagelos desempeñan un papel importante en la adhesión a sustratos, la formación de biopelículas y contribuyen a la virulencia en bacterias patógenas (Mahajan *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 2006; Ottemann y Miller, 1997; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007)

El flagelo bacteriano es un orgánulo muy complejo, pero consta de una estructura básica en la que se pueden distinguir tres partes: el cuerpo basal, que ancla el flagelo a la envoltura celular bacteriana y contiene el motor de rotación, el gancho o codo, que es un cilindro curvado y flexible que convierte el movimiento de rotación en ondas, y el filamento, un tubo hueco constituido por una proteína mayoritaria

denominada flagelina que propaga las ondas iniciadas por el gancho e impulsa a la bacteria (Figura 8; Bardy *et al.*, 2003; Smith y Hoover, 2009).

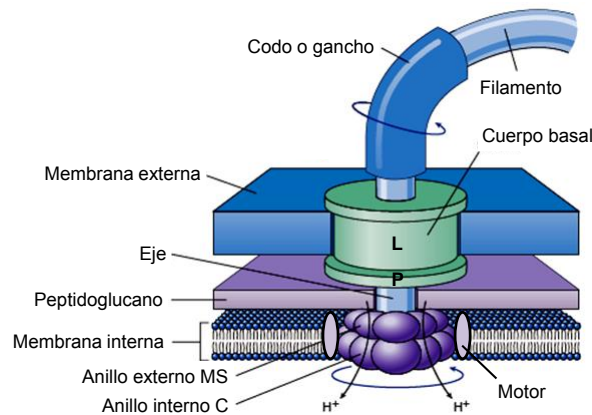


Figura 8. Esquema de los principales componentes del flagelo.

El cuerpo basal está conformado por los anillos (C, MS, P y L), el eje, los complejos de proteínas del motor (Mot) y el aparato de exportación flagelar (bajo el anillo C). El eje se extiende entre el cuerpo basal y el gancho, pasando a través de varios anillos de proteínas en las membranas celulares. El filamento es un tubo hueco helicoidal que presenta una curvatura (codo o gancho) en la zona de anclaje a la membrana externa, que convierte el movimiento giratorio del eje en helicoidal.

En la construcción del flagelo bacteriano intervienen unas 50 proteínas, entre proteínas estructurales, accesorias y reguladoras. Los componentes integrales de membrana (excluyendo las proteínas Mot de motor), el doble anillo MS y el anillo C emplean la ruta Sec para su secreción, pero la mayor parte de las proteínas localizadas por fuera de la membrana citoplasmática, usan una variante del T3SS (Macnab, 2004; Minamino *et al.*, 2008). El orden de ensamblaje del flagelo es lineal y secuencial; es decir, tiene lugar desde las subestructuras más proximales hasta las más distales. Debido a esta complejidad y a su interacción con las envueltas bacterianas, la síntesis de los diversos componentes y su ensamblaje están sometidos a un estricto control mediante una jerarquía transcripcional que permite la regulación coordinada y temporal de decenas de genes (Macnab, 2003; Anderson *et al.*, 2010). Así, los primeros genes que se expresan codifican proteínas reguladoras que inician la transcripción de los genes estructurales tempranos, que se necesitan en las primeras etapas del ensamblaje del flagelo. Estas proteínas reguladoras se denominan reguladores maestros y los genes que las codifican, genes de clase I. La regulación de la biosíntesis del flagelo está muy bien estudiada en *P. aeruginosa*, que posee un flagelo polar, y consta de cuatro niveles (Figura 9; Dasgupta *et al.*, 2003).

FleQ, el regulador maestro flagelar en *Pseudomonas*, es un activador dependiente de σ^{54} que regula directa o indirectamente la expresión de la mayoría de los genes flagelares, a excepción de FliA, por lo que *fleQ* y *fliA* se consideran genes de clase I (Arora *et al.*, 1997; Dasgupta *et al.*, 2003). En *P. aeruginosa* la transcripción de *fleQ* depende del factor σ^{70} y su expresión está modulada por Vfr y AlgT. Vfr es un homólogo de la proteína CRP (*cAMP-receptor protein*) que se une al promotor de *fleQ* impidiendo su

expresión (Dasgupta *et al.*, 2002) y AlgT (σ^E) es un factor sigma alternativo que promueve la expresión de AmrZ, un regulador transcripcional que reprime la expresión de *fleQ* (Tart *et al.*, 2005, 2006). Por otra parte, la expresión de *fliA* parece ser constitutiva y no depende de σ^{54} o de otros reguladores flagelares (Dasgupta *et al.*, 2003). FleQ activa la transcripción de los genes de clase II, que codifican los componentes del cuerpo basal, del motor y del sistema de secreción, así como las proteínas reguladoras FleN y FleS/R. FleN interacciona con FleQ regulando negativamente su actividad, lo que restringe el número de flagelos y el sistema de dos componentes FleS/R es necesario para la expresión de los genes de clase III, que codifican el resto de los componentes del cuerpo basal, del gancho y de las proteínas asociadas al gancho (Dasgupta y Ramphal, 2001). Los genes de la clase IV son dependientes de FliA (σ^{28}) y codifican la flagelina, las proteínas de quimiotaxis y la proteína reguladora FlgM (Figura 9; Dasgupta *et al.*, 2003).

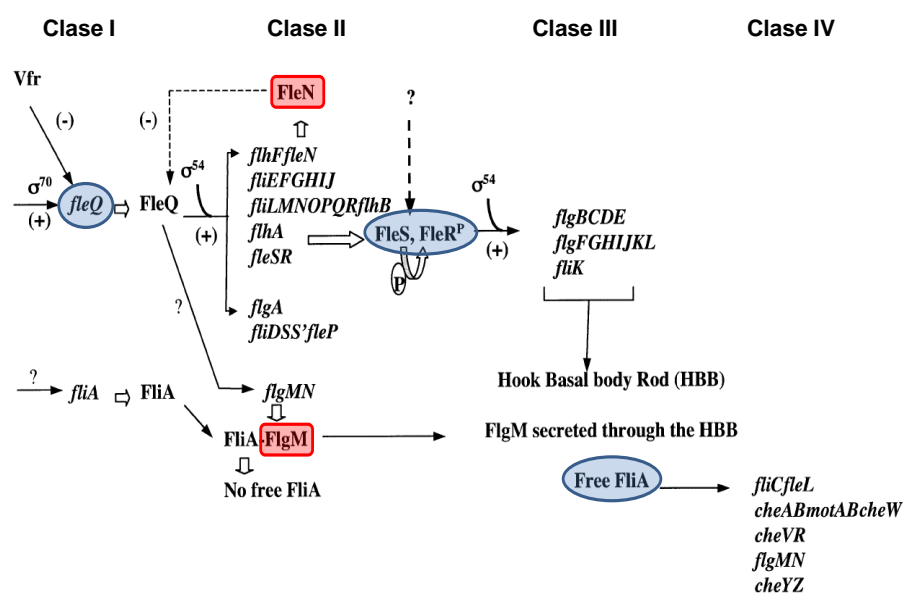


Figura 9. Jerarquía transcripcional de expresión de los genes flagelares en *P. aeruginosa*. - y +, regulación negativa y positiva, respectivamente; ?, factor(es) desconocido(s). La fosforilación de FleR por FleS se indica mediante la transferencia del grupo fosfato (P). Modificado de Dasgupta *et al.* (2003).

El complejo σ^{54} /ARN polimerasa requiere la acción de activadores específicos, también denominados EBP para poder iniciar la transcripción (Morett y Segovia, 1993; Schumacher *et al.*, 2006). Los activadores σ^{54} son máquinas moleculares que pertenecen a la superfamilia AAA⁺ de ATPasas asociadas a diversas actividades celulares que se unen a unas secuencias específicas (UAS, *upstream activation sequence*) situadas 100-150 pb aguas por encima del sitio de inicio de la transcripción desde donde contactan con el complejo cerrado σ^{54} -ARN polimerasa/ADN gracias a un bucle en el ADN, a menudo facilitado por proteínas auxiliares, como IHF (*Integration Host Factor*), que se unen entre las UAS y el promotor (Huo *et al.*, 2006). NtrC, ZraR, PspF, NorR, DctD, NifA o HrpR/S son EBP bien caracterizadas (Studholme y Dixon, 2003; Ogura y Wilkinson, 2001). FleQ es también una proteína de este tipo y, como tal, presenta una arquitectura en tres dominios con un dominio N-terminal regulador que interacciona con su antiactivador

FleN, un dominio de activación central que posee actividad ATPasa e interacciona con el factor σ^{54} y un dominio C-terminal con un motivo HTH de unión a ADN (Schumacher *et al.*, 2006; Hickman y Harwood, 2008). FleQ funciona como activador para la expresión de varios operones flagelares, pero, como se ha mencionado anteriormente, la unión de c-di-GMP inhibe su actividad ATPasa y provoca una disminución en la expresión de dichos operones. Esta acción inhibitoria del c-di-GMP es aún más notoria en presencia de FleN (Baraquet y Harwood, 2013). Además, FleQ también funciona como represor de varios genes implicados en la producción de EPS, como Pel o Psl. Esta represión es independiente de σ^{54} y se convierte en inducción tras unir de manera específica c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012).

La motilidad dependiente de flagelos se encuentra regulada por el c-di-GMP en diversas bacterias a nivel transcripcional, postranscripcional, postraducciona l e, incluso, funcional (Wolfe y Visick, 2008). El efecto del c-di-GMP a nivel transcripcional sobre la motilidad ocurre a través de la represión de genes estructurales y reguladores implicados en la biogénesis flagelar (Wolfe y Visick, 2008). Aparte de la mencionada regulación a través de FleQ, existen otros ejemplos del control del c-di-GMP a nivel transcripcional. En *V. cholerae* el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de la DGC CdgF causa una disminución de la expresión de los genes de las clases III y IV, entre los que se encuentra *fliC* (Beyhan *et al.*, 2006; Wolfe y Visick, 2008). En *P. putida* la proteína híbrida MorA (DGC/PDE) modula la motilidad de esta bacteria a nivel transcripcional, ya que en mutantes carentes de ella aumenta la expresión de *fliC* y las células están hiperflageladas (Choy *et al.*, 2004). Por el contrario, la disminución artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de la PDE YhjH de *S. typhimurium*, incrementa la motilidad tipo *swarming* en esta bacteria (Christen *et al.*, 2007; Wolfe *et al.*, 2008).

A nivel postraducciona l, la unión del c-di-GMP a determinadas proteínas efectoras promueve su interacción con determinadas proteínas flagelares modificando su funcionamiento. Como se mencionó anteriormente, este efecto negativo de los altos niveles del c-di-GMP está mediado por proteínas con dominios PilZ. Así, YcgR de *S. enterica* serovar *Typhimurium* y de *E. coli* o DgrA y DgrB de *C. crescentus* se unen al c-di-GMP e interaccionan con el motor flagelar, bloqueando su rotación (Christen *et al.*, 2007; Boehm *et al.*, 2010; Armitage y Berry, 2010; Paul *et al.*, 2010).

Además de la regulación de la motilidad por c-di-GMP a nivel transcripcional y postraducciona l, existe también una regulación a nivel funcional. Así, el incremento de los niveles de c-di-GMP en *Salmonella* provoca un aumento en la producción de celulosa mediante la activación alostérica del dominio PilZ de la proteína BscA. La producción y acumulación de este EPS genera un impedimento estérico que impide el correcto funcionamiento del flagelo y causa una disminución de la motilidad independientemente de la regulación postraducciona l por YcgR (Zorraquino *et al.*, 2012).

3.2. Formación de biopelículas

Las biopelículas son agregados bacterianos que se encuentran envueltos en una matriz extracelular compuesta de proteínas, EPS y ADN extracelular (Flemming y Wingender, 2010). Además de inmovilizar a las bacterias y proporcionar una estructura de soporte, la matriz atrapa nutrientes y diversas moléculas biológicamente activas, como señales de *quorum sensing*, y se comporta como un sistema de digestión externo, ya que también contiene enzimas que degradan diferentes componentes de la matriz, nutrientes u otros sustratos, poniendo los productos a disposición de las células, lo que facilita su absorción. Por otra parte, la matriz proporciona protección frente a distintos estreses ambientales, compuestos antimicrobianos, como toxinas o antibióticos, depredadores o fagocitosis. Las biopelículas son sistemas complejos y dinámicos que, además, permiten la colonización de superficies (O'Toole *et al.*, 1998a; 1998b; Römling *et al.*, 2013). A lo largo del proceso de formación de biopelículas generalmente se distinguen varias etapas (Figura 10). El proceso comienza cuando células libres entran en contacto con una superficie y se adhieren de manera reversible a ésta. A continuación, comienzan a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio inicial de unión formando una microcolonia que está ahora irreversiblemente adherida a la superficie. En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar distintos compuestos, como EPS, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que constituyen la matriz de la biopelícula hasta que las microcolonias quedan completamente embebidas en la misma, dando lugar a una biopelícula madura. Finalmente, el proceso concluye (o vuelve a empezar) con la liberación de algunas células móviles que van a colonizar nuevas superficies (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Aunque la definición canónica de biopelícula incluye su asociación con una superficie sólida, hay estructuras multicelulares similares a biopelículas que flotan en la interfase líquido-aire. Los requisitos para la formación de este tipo de agrupaciones son también el contacto entre células, la acumulación de EPS y, además, el crecimiento en condiciones estáticas (Ude *et al.*, 2006). La capacidad para producir biopelículas en la interfase líquido-aire está muy extendida entre las cepas ambientales de *Pseudomonas* en las que la celulosa es el componente extracelular mayoritario (Ude *et al.*, 2006).

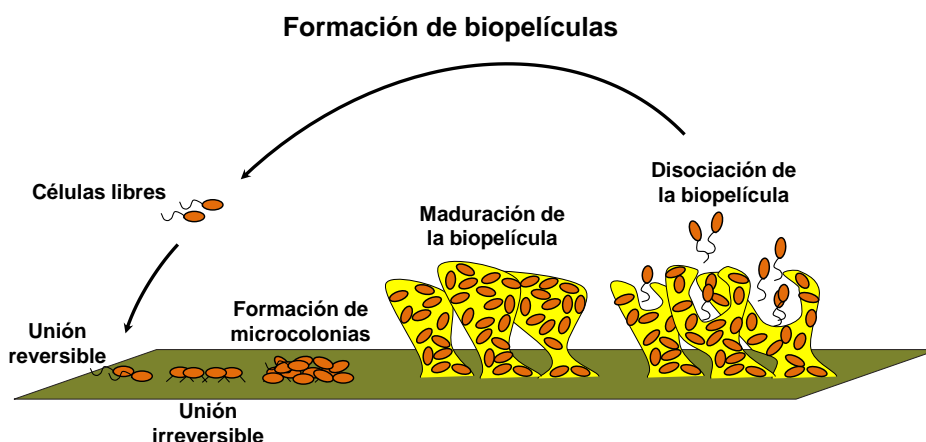


Figura 10. Esquema general de la formación de biopelículas. Modificado de Hirsch *et al.* (2009).

La conclusión tras numerosos estudios sobre el papel del c-di-GMP en la formación de biopelículas es que este segundo mensajero estimula la formación de las mismas (Rashid *et al.*, 2003; Kirillina *et al.*, 2004; Simm *et al.*, 2004; Kader *et al.*, 2006; Kulasekara *et al.*, 2006; Mendez-Ortiz *et al.*, 2006; Thormann *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006; Merritt *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2007; Nakhamchik *et al.*, 2008). Esto es cierto para distintos tipos de biopelículas como, por ejemplo, las que se forman en la interfase superficie-aire, líquido-aire, las colonias rugosas y arrugadas tipo *rdar* (*red, dry and rough*), *WS* (*wrinkly spreader*) y *RSCV* (*rugose small-colony variants*) (Branda *et al.*, 2005; Römling *et al.*, 2005; Yildiz y Visik, 2009) y las biopelículas adheridas a superficies abióticas en condiciones estáticas o de flujo continuo. En *P. aeruginosa*, las colonias mucosas y las *RSCV* comúnmente aisladas de pacientes con fibrosis quística están asociadas a altos niveles de c-di-GMP y a una gran facilidad para la formación de biopelículas (Meissner *et al.*, 2007; Starkey *et al.*, 2009; Hay *et al.*, 2009; Malone *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

Todos los componentes de la matriz extracelular que contribuyen a la formación y maduración de las biopelículas, incluyendo diversos EPS, *pili*, adhesinas e incluso el ADN extracelular, se encuentran regulados a nivel transcripcional y postraduccional por el c-di-GMP (Römling *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *P. putida* la expresión de *lapA*, que codifica una adhesina esencial para la formación de biopelículas, es dependiente de FleQ y c-di-GMP (Fazli *et al.*, 2014; Martínez-Gil *et al.*, 2014). Asimismo, en *K. pneumoniae* la producción de fimbrias tipo 3 implicadas en la formación de biopelículas sobre superficies abióticas está regulada por el c-di-GMP, que induce la expresión del operón *mrkABCDF* a través del regulador transcripcional MrkH (Johnson *et al.*, 2011; Wilksch *et al.*, 2011). Del mismo modo, la producción de fimbrias en *P. aeruginosa* también está regulada positivamente por el c-di-GMP a nivel transcripcional mediante la inducción del operón *cupABCDFE* a través de las actividades DGC de MorA, YfiN y SiaD (Meissner *et al.*, 2007; Klebensberger *et al.*, 2009). Por otra parte, la secreción de la adhesina LapA en *P. fluorescens* se encuentra regulada a nivel postraduccional por c-di-GMP, ya que su unión al motivo EAL degenerado de LapD induce la secreción de LapA, que es esencial para la formación de biopelículas en esta bacteria (Newell *et al.*, 2009). A su vez, en bacterias como *X. axonopodis* pv. *citri* y *P. aeruginosa* la producción de *pili* tipo IV también es necesaria para la formación de biopelículas y se encuentra regulada a nivel postraduccional por c-di-GMP (Guzzo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Guzzo *et al.*, 2013).

3.3. Producción de exopolisacáridos

Tal y como se ha indicado anteriormente, una de las moléculas reguladas por c-di-GMP, claves en la formación de las biopelículas bacterianas son los EPS. Las bacterias de la familia Pseudomonadaceae producen una gran variedad de estos compuestos en función de los niveles de c-di-GMP, entre los que se encuentran Psl, Pea, Pel, levano, alginato y celulosa (Mann y Wozniak, 2012). Esta diversidad de EPS incluso entre miembros filogenéticamente cercanos sugiere que tienen implicaciones biológicas diferentes. Así, hay polisacáridos que favorecen la agregación y ofrecen integridad estructural al interactuar con otros componentes de la matriz, mientras que otros se sitúan en el exterior de una o más células y tienen una función protectora frente a las condiciones adversas o los mecanismos de defensa del hospedador y/o sirven para el almacenamiento de nutrientes (Mann y Wozniak, 2012). En algunos casos, parece que

algunos EPS pueden ser sustituidos por otros con funciones similares. Por ejemplo, *P. putida* no posee el operón *psl* pero produce EPS A (Pea) importante para la adhesión entre las células (Ude *et al.*, 2006); *P. aeruginosa* no sintetiza celulosa (*wss*) pero produce Pel, necesario para la formación de biopelículas en esta bacteria (Friedman y Kolter, 2004a; 2004b) y *Pto* no tiene el operón *pel*, pero presenta todos los genes necesarios para la síntesis de celulosa (Whitney y Howell, 2013).

Distintos trabajos han puesto de manifiesto la importancia del c-di-GMP en la inducción de la síntesis de distintos EPS. Por ejemplo, los fenotipos de colonia *rdar*, *WS* y *RSCV* de *Salmonella* y *Pseudomonas* son dependientes de altos niveles de c-di-GMP (Friedman y Kolter, 2004b; Römling, 2005; Kader *et al.*, 2006; Starkey *et al.*, 2009) y ocurren por el incremento en la producción de celulosa, alginato, levano o polisacáridos ricos en celulosa y manosa. La producción de compuestos extracelulares, tanto EPS como proteínas, pueden detectarse e incluso cuantificarse mediante el uso de agentes de tinción como el Congo Red (CR) o el calcoflúor (CF). El Congo Red es un colorante que, añadido a las placas de medio sólido, permite detectar la producción de componentes extracelulares tales como polisacáridos neutros o básicos y algunas proteínas. El CF se une de manera más específica a polisacáridos con enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$ y $\beta(1-3)$ presentes, por ejemplo, en la celulosa y hace que las colonias positivas emitan fluorescencia bajo luz ultravioleta (Spiers *et al.*, 2002).

3.3.1. Alginato

Es uno de los polisacáridos mejor estudiados en *Pseudomonas*. Este polímero acetilado de alto peso molecular está formado por monómeros no repetitivos de ácidos D-manurónico y L-gulurónico unidos por enlaces $\beta(1,4)$ (Evans y Linker, 1973; Osman *et al.*, 1986). Los genes necesarios para la síntesis y secreción de este EPS se localizan en un operón de 12 genes que está conservado tanto a nivel de secuencia como de organización génica en *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* y *P. syringae* (Peñaloza-Vázquez *et al.*, 1997; Fakhr *et al.*, 1999.; Li *et al.*, 2010). El gen *algC*, con una localización cromosómica diferente a la del operón *alg* y que codifica una fosfomanomutasa, es también esencial para la biosíntesis de alginato (Zielinski *et al.*, 1991; 1992). En *P. aeruginosa* el alginato contribuye a la persistencia y la evasión del sistema inmunológico, ya que confiere resistencia a diferentes compuestos antimicrobianos y a la fagocitosis por macrófagos (revisado en Mann y Wozniak, 2012). La producción de este polisacárido en *P. fluorescens* CHA0 está relacionada con una mayor resistencia al estrés osmótico y a la desecación, así como a una mejor adherencia a las raíces (Schnider-Keel *et al.*, 2001; Bianciotto *et al.*, 2001). En el caso de *P. syringae*, se ha observado que el daño en los tejidos vegetales asociado con HR se correlaciona con un aumento en la expresión de *algD* (Keith *et al.*, 2003).

La síntesis del alginato se encuentra regulada a nivel transcripcional por AmrZ y a nivel postraduccional por c-di-GMP. AmrZ (*alginate and motility regulator*), originalmente denominado AlgZ y caracterizado en *P. aeruginosa*, es un regulador transcripcional que puede actuar como represor y como activador. Aparte de actuar como un activador de la transcripción del operón de síntesis del alginato, también regula positivamente los genes que codifican los *pili* tipo IV y reprime la expresión del regulador maestro flagelar *fleQ*, el operón *psl* y su propio gen (Baynham *et al.*, 1996; 1999; Ramsey *et al.*, 2005; Tart *et al.*, 2005;

Baynham *et al.*, 2006; Tart *et al.*, 2006; Pryor *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). El ortólogo de AmrZ en Pto ha sido anotado como un represor transcripcional, presenta un dominio Arc (PFO3869) involucrado en la unión al ADN a través de una lámina β , y un dominio HicB (PFO5534) cuya función se relaciona con la formación de *pilus* (Raumann *et al.*, 1994; Mhlanga-Mutangadura *et al.*, 1998).

En *P. aeruginosa* AmrZ regula de manera inversa la expresión de los operones *alg* y *psl* (Jones *et al.*, 2013). Sin embargo, el efecto regulador de AmrZ sobre la producción de EPS no solo tiene lugar a nivel transcripcional sobre los genes implicados directamente en su síntesis. AmrZ reprime además la expresión del regulador de respuesta AdcA (PA4843, REC-REC-GGDEF), cuya actividad DGC afecta a la morfología de colonia y a la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* PAO1 (Jones *et al.*, 2014). Como ya se ha mencionado anteriormente, muchos de los EPS producidos por *Pseudomonas* y otras bacterias están sometidos a un control postraduccional mediado por c-di-GMP (Whitney y Howell, 2013). En el caso concreto de la síntesis de alginato, la regulación por c-di-GMP a nivel postraduccional ocurre tras la unión de este segundo mensajero al dominio PilZ de la proteína Alg44, lo que induce la actividad alginato sintasa de Alg8 (Figura 11, Merighi *et al.*, 2007; Oglesby *et al.*, 2008; Whitney y Howell, 2013).

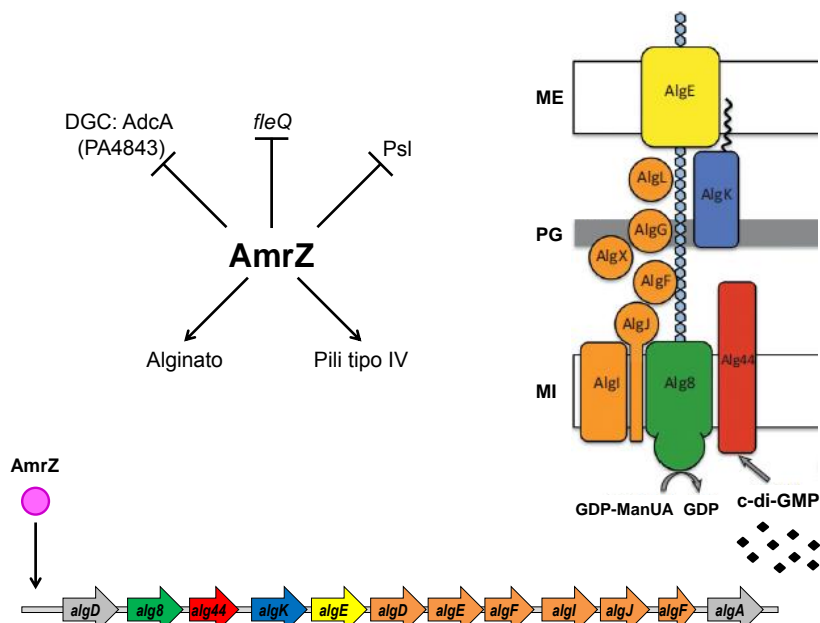


Figura 11. Mecanismos de regulación de la producción de alginato mediados por AmrZ en *P. aeruginosa*. Modificado de Whitney y Howell (2013).

3.3.2. Psl

El Psl está formado por un pentasacárido repetido que contiene D-manosa, D-glucosa y L-ramnosa y se puede encontrar en, al menos, dos formas: una de alto peso molecular asociada a las células y otra soluble de menor peso molecular que se puede aislar del sobrenadante de cultivos (Byrd *et al.*, 2009). En *P. aeruginosa* los genes necesarios para la síntesis y secreción de este EPS forman un operón de 15 genes (Friedman y Kolter, 2004a; b; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa y Greenberg, 2004). Sin embargo, sólo se requieren 11 para la formación de biopelículas, ya que la función de PslB es redundante con

WbpW y los tres últimos genes del operón, *pslMNO*, tampoco son necesarios (Byrd *et al.*, 2009). El Psl es extremadamente importante para la adherencia inicial de las células sésiles a sustratos, tanto bióticos como abióticos, colabora en la arquitectura de la biopelícula madura y también proporciona protección frente al sistema inmune (Ma *et al.*, 2006; 2009; Byrd *et al.*, 2009; 2010; Mishra *et al.*, 2012). La síntesis de Psl en *P. aeruginosa* está regulada a nivel transcripcional por RpoS y a nivel postranscripcional por RsmA (Starkey *et al.*, 2009; Borlee *et al.*, 2010; Irie *et al.*, 2010). A su vez, el c-di-GMP controla de forma positiva la producción de Psl, probablemente a nivel postraduccional a través de la actividad de la DGC WspR (REC-GGDEF) (Hickman *et al.*, 2005; Huangyutham *et al.*, 2013).

El operón *psl* también está conservado en varias otras *Pseudomonas* (Nelson *et al.*, 2002; Buell *et al.*, 2003; Vodovar *et al.*, 2006; Winsor *et al.*, 2009). Por ejemplo, *P. syringae* pv. *syringae* B728a posee 12 de los 15 genes del operón *psl*; sólo faltan *pslL*, *pslM* y *pslS*, de los que solo *pslL* ha demostrado ser necesario para la producción de Psl (Byrd *et al.*, 2009). Sin embargo, en el genoma de *Psyr* se encuentra un gen entre *pslJ* y *pslK* (*Psyr3310*), que codifica una acil transferasa que podría ejercer la función de *PsilL* (Stover *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2005; Winsor *et al.*, 2009). Curiosamente, en *P. fluorescens* Pf-5, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A y pv. *tomato* DC3000, y *P. mendocina* ymp, la organización del operón *psl* es similar a la de *Psyr* (Stover *et al.*, 2000; Feil *et al.*, 2005; Joardar *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2005; Winsor *et al.*, 2009). Por el contrario, *P. fluorescens* Pf0-1 carece de la mayoría de los genes del operón *psl*, pero esto no afecta a su capacidad para formar biopelículas (Winsor *et al.*, 2009), a diferencia de *P. aeruginosa*, lo que indica que otro(s) EPS deben ejercer esa función. Asimismo, el Psl no es necesario en las biopelículas producidas por *P. aeruginosa* PA14, que carece de los genes *pslABCD* (Friedman y Kolter, 2004a; b; Lee *et al.*, 2006).

3.3.3. Pel

El polisacárido Pel es necesario para la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* PA14 pero, a diferencia del polisacárido Psl, no se conocen ni su composición ni su estructura (Friedman y Kolter, 2004a; b) pero sí que su producción es máxima cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados (Lee *et al.*, 2007). El operón *pel* está compuesto por 7 genes que sorprendentemente, no están presentes en *P. syringae*, *P. putida* o *P. mendocina* (Friedman y Kolter, 2004a, b). Además, esos 7 genes no parecen ser suficientes para la biosíntesis completa del EPS, por lo que la maquinaria Pel debe funcionar con otras enzimas (Franklin *et al.*, 2011). De hecho, se ha observado una mayor producción de Pel en ausencia de Psl que sugiere la existencia de interferencias entre la producción de ambos EPS (Ghafoor *et al.*, 2011).

Pel interviene en la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire y causa agregación en los medios de cultivo de laboratorio. En las cepas que producen Psl y Pel, el Psl es predominante; sin embargo, cuando no está presente el operón *psl*, como en la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, o cuando los niveles de c-di-GMP son elevados, Pel tiene un claro impacto en la formación de biopelículas (Friedman y Kolter, 2004a; b). Además de su papel estructural, Pel parece atenuar el efecto de determinados antibióticos, como la tobramicina, durante la formación de biopelículas (Colvin *et al.*, 2011a; b).

En *P. aeruginosa*, el c-di-GMP regula la expresión de los operones *psl* y *pel* a través del regulador maestro de la biogénesis flagelar FleQ (Hickman y Harwood, 2008). Inicialmente se observó que FleQ reprimía la expresión del operón *pel* uniéndose a su región promotora en complejo con FleN y que la unión de c-di-GMP por FleQ inducía su disociación del promotor *pel*, lo que permitía su transcripción (Hickman y Harwood, 2008). Posteriormente, se ha demostrado que FleQ tiene una doble función en la regulación de este operón. Así, se han identificado dos motivos de unión de FleQ (caja 1 y caja 2, con un motivo conservado ATTGAC) en la región promotora de dicho operón y se ha determinado que FleQ reprime la expresión del operón *pel* desde la caja 2 y la activa en respuesta a c-di-GMP desde la caja 1 (Figura 12). El papel del c-di-GMP es convertir el represor FleQ en activador (Baraquet *et al.*, 2012).

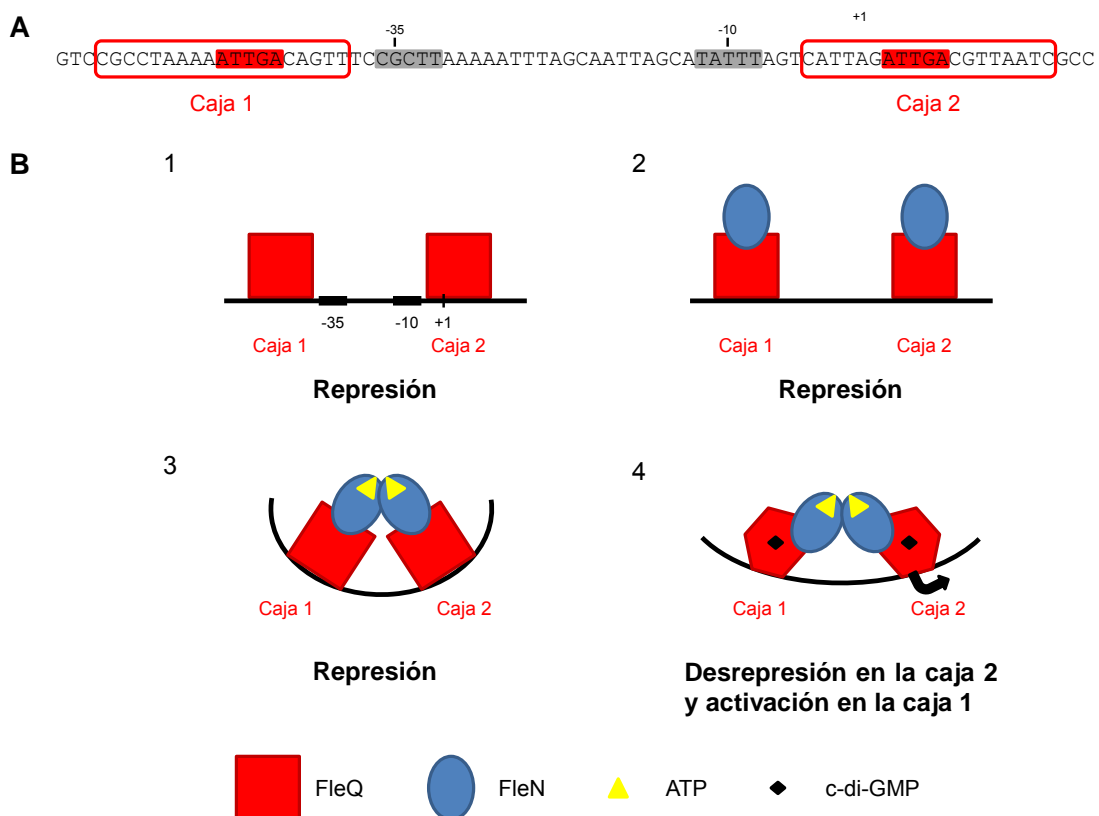


Figura 12. Regulación del operón *pel* de *P. aeruginosa*.

A. Secuencia de nucleótidos de la región promotora del operón *pel*. Se indican los dos sitios de unión de FleQ (cajas 1 y 2) en los que las secuencias repetidas aparecen resaltadas en rojo. Se indican las posiciones -10 y -35 del promotor de *pel*, el punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha).

B. Modelo de regulación del operón *pel* por FleQ. FleQ se une a las cajas 1 y 2 en el promotor del operón *pel*, reprimiendo su expresión, tanto en ausencia (1) como en presencia de FleN (2). También en presencia de ATP, pero en este caso induce una distorsión en el ADN (3). La unión de FleQ a la caja 2 es esencial para reprimir la expresión del operón *pel*. Cuando FleQ se une al c-di-GMP se produce un cambio conformacional probablemente propagado por FleN, que elimina la distorsión en el ADN e induce la expresión de *pel* (4). La unión de FleQ a la caja 1 es esencial para la activación transcripcional del operón *pel*. Modificado de Baraquet *et al.* (2012).

3.3.4. Celulosa

La celulosa es otro EPS sintetizado por un gran número de cepas ambientales (Ude *et al.*, 2006). Es un homopolímero lineal de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$ y sintetizado por un complejo proteico anclado a la membrana (Römling *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013). La biosíntesis de celulosa bacteriana fue descrita por primera vez en *G. xylinus* y, posteriormente, en una gran variedad de bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *S. enterica* y *Vibrio fischeri*, entre otras (Figura 13; Hestrin *et al.*, 1947; Ross *et al.*, 1987; Zogaj *et al.*, 2001; Bassis y Visick, 2010).

La producción y secreción de este polímero requiere, al menos, tres subunidades, denominadas BcsA, BcsB y BcsC en *E. coli* y cuyos ortólogos en Pto DC3000 son WssB, WssC y WssE (Morgan *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013; Figura 13A). La proteína de membrana interna BcsA de *E. coli* (AcsA en *G. xylinus* o WssB en Pto) es la subunidad catalíticamente activa que se encuentran asociada a la membrana. Presenta un dominio citoplasmático con actividad glucosiltransferasa de la familia II (GT-2) que cataliza la polimerización de la celulosa a partir de UDP-glucosa y facilita la translocación del polímero recién sintetizado a través de la membrana interna. Además, BcsA posee un dominio PilZ en su extremo C-terminal que activa la producción de celulosa tras su unión a c-di-GMP (Figura 13B; Ryjenkov *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013). La proteína BcsB (AcsB, WssC) es una proteína periplásmica que interacciona con BcsA a través de un segmento transmembrana situado en su extremo C-terminal. Con él se ancla a la membrana interna y permite el transporte del polisacárido a través del espacio periplásmico. BcsC (AcsC, WssE) es una proteína de membrana externa que contiene un dominio porina en su extremo C-terminal y un dominio N-terminal TPR (*tetratricopeptide repeat*) que se localiza en el periplasma, y es necesaria para la síntesis *in vivo* y la extrusión de la celulosa al exterior de la célula (Saxena *et al.*, 1994; Standal *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013). El gen *bcsZ* se encuentra dentro del operón biosintético de la celulosa en algunas bacterias o en otro lugar del genoma en otras y codifica una enzima periplásmica con actividad endo- β -1,4-glucanasa que parece ser necesaria para la degradación de la celulosa acumulada en el periplasma y/o la escisión de cadenas de celulosa nacientes, lo que permite la formación de microfibrillas fuera de la célula (Mazur y Zimmer, 2011). BcsQ es homóloga a la proteína de división celular MinD de *E. coli* que se localiza en el polo de las células, por lo que podría determinar la localización polar del aparato de biosíntesis de la celulosa en *E. coli*, *S. enterica* o *Burkholderia cenocepacia* (Le Quere y Ghigo, 2009). La proteína AcsD, que es única en *G. xylinus*, se organiza como un homo-octámero y es capaz de unir celulosa (Hu *et al.*, 2010). Se cree que el multímero AcsD se sitúa extracelularmente y que su función es retorcer las fibrillas de celulosa recién sintetizadas generando fibras de orden superior (Saxena *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2010). Esta hipótesis ayudaría a explicar por qué *G. xylinus* produce celulosa fibrilar mientras que otras bacterias que carecen del homólogo de AcsD, como *E. coli*, producen celulosa amorfa.

P. fluorescens SBW25 y Pto DC3000 producen una forma acetilada de la celulosa cuya síntesis requiere el operón *wss* (Figura 13A; Spiers *et al.*, 2003; Ude *et al.*, 2006). Este operón codifica no sólo las proteínas implicadas en la secreción de celulosa no acetilada (WssA/BcsQ, WssB/BcsA, WssC/BcsB, WssD/BcsZ y WssE/BcsC), sino también proteínas que se asemejan a las que participan en la acetilación

del alginato (WssG/AlgF, WssH/AlgI y WssI/AlgJ) (Figuras 11 y 13). WssF participa también en la acetilación de la celulosa, pero no parece existir una proteína funcionalmente similar implicada en la acetilación del alginato. Además, el operón *wss* de *P. fluorescens* SBW25 contiene un segundo homólogo de WssJ, que no está presente en Pto, y que se piensa que juega un papel en la localización celular de las proteínas que acetilan la celulosa (Spiers *et al.*, 2003). No obstante, la caracterización de la síntesis de celulosa acetilada por estas bacterias está todavía en sus inicios y aún hay que confirmar experimentalmente las funciones propuestas para cada una de las proteínas.

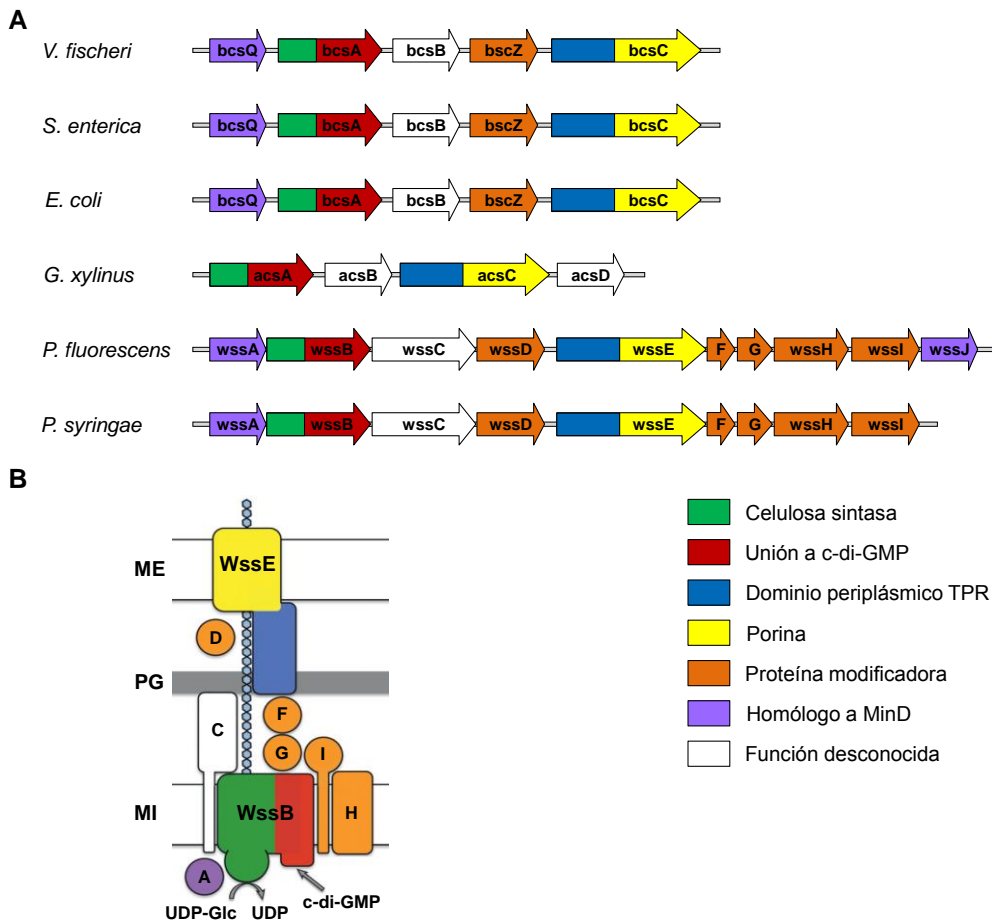


Figura 13. Operón de síntesis de celulosa en distintas bacterias. Modificado de Whitney y Howell, 2013.

A. Operones para la síntesis de celulosa y celulosa acetilada en diferentes bacterias Gram-negativas. Cada ORF se muestra como una flecha (no están dibujadas a escala) y su función está indicada por su color, como se describe en la leyenda de la figura. Las ORF con dos colores tienen atribuidas dos funciones.

B. Representación esquemática del sistema de síntesis y secreción de celulosa acetilada de Pto DC3000. Cada componente tiene un color según su función: verde, sintasa; rojo, dominio PilZ; azul, dominio TPR; amarillo, porina; naranja, enzimas modificadores de la celulosa; púrpura, homólogo de MinD; y blanco, función desconocida. Abreviaturas: MI, membrana interna; PG, peptidoglicano; ME, membrana externa; UDP-Glc, UDP-glucosa.

Al igual que ocurre con otros EPS, la producción de celulosa se encuentra regulada por c-di-GMP. Fue precisamente en *G. xylinus* donde se describió por primera vez que el c-di-GMP actuaba como un activador alostérico de la producción de celulosa mediante su unión al dominio PilZ de la celulosa sintasa

Introducción

Curiosamente, el efecto regulador del c-di-GMP sobre el operón de síntesis de celulosa a nivel transcripcional está poco documentado ya que existen escasos ejemplos. En *B. cenocepacia* es el activador transcripcional Bcam1349 el que induce la expresión del operón de síntesis de la celulosa. Bcam1349 es un regulador tipo CRP con alta afinidad por c-di-GMP que, tras unirse a él, se une al promotor del operón de la celulosa sintasa potenciando su transcripción (Fazli *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es descifrar cómo las bacterias fitopatógenas detectan y responden a las señales de su entorno, cómo esas señales se transmiten a la maquinaria celular a través del segundo mensajero bacteriano c-di-GMP y cómo esto, a su vez, promueve la colonización de la planta y el desarrollo de la enfermedad.

De forma más concreta este trabajo se centra en el estudio del papel que juega el segundo mensajero c-di-GMP en la fisiología de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Los objetivos específicos son:

1. Análisis *in silico* de las proteínas que interaccionan con el c-di-GMP en *P. syringae* pv. tomato DC3000, así como el estudio comparativo con otras bacterias que interaccionan con plantas.
2. Caracterización fenotípica de *P. syringae* pv. tomato DC3000 en condiciones de altos niveles intracelulares de c-di-GMP.
3. Identificación de funciones reguladas por el c-di-GMP en *P. syringae* pv. tomato DC3000 y su implicación en la interacción con la planta hospedadora.
4. Implicación del c-di-GMP en la regulación de la producción de celulosa en *P. syringae* pv. tomato DC3000.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y plásmidos

1.1. Cepas bacterianas

La cepa principal objeto de estudio en este trabajo ha sido *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) DC3000 (Cuppels, 1986). Otras cepas bacterianas utilizadas derivadas de Pto DC3000 incluyen los mutantes generados en los genes de interés y algunas cepas de *E. coli* empleadas principalmente como hospedadoras de plásmidos. La lista de cepas utilizadas y sus características más relevantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato		
Pto DC3000	Rif ^r	Cuppels, 1986
Pto <i>amrZ</i>	Gm ^r ; <i>amrZ</i> ::Gm	Este trabajo
Pto <i>amrZ/fleQ</i>	Rif ^r , Km ^r , Gm ^r ; <i>fleQ</i> ::ΩKm, <i>amrZ</i> ::Gm	Este trabajo
Pto <i>fleQ</i>	Rif ^r , Km ^r ; <i>fleQ</i> ::ΩKm	Este trabajo
Pto <i>fliC</i>	Rif ^r , Cm ^r ; <i>fliC</i> ::mini Tn5Cm	Roine <i>et al.</i> , 1998
Pto <i>hrpL</i>	Rif ^r , Km ^r , <i>hrpL</i> ::ΩKm	Aragón <i>et al.</i> , no publicado
Pto Δ <i>wssBC</i>	Rif ^r , <i>wssBC</i>	Este trabajo
Pto 0463:Tn5	Rif ^r , Km ^r ; PSPTO_0463::Tn5Km	Este trabajo
Pto 1026:Tn5	Rif ^r , Km ^r ; PSPTO_1026::Tn5Km	Este trabajo
Pto 1030:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_1030::Tn5Km	Este trabajo
Pto 1994:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_1994::Tn5Km	Este trabajo
Pto 2004:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_2004::Tn5Km	Este trabajo
Pto 4631:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_4631::Tn5Km	Este trabajo
Pto 5022:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_5022::Tn5Km	Este trabajo
Pto 5191:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_5191::Tn5Km	Este trabajo
Pto 5409:Tn5	Rif ^r , Km ^r , PSPTO_5409::Tn5Km	Este trabajo
Pto <i>fliC</i> /1027:Tn5	Rif ^r , Cm ^r , Km ^r ; PSPTO_1027::Tn5Km	Este trabajo
Pto <i>fliC</i> /1030:Tn5	Rif ^r , Cm ^r , Km ^r ; PSPTO_1030::Tn5Km	Este trabajo
Pto <i>fliC</i> /1847:Tn5	Rif ^r , Cm ^r , Km ^r ; PSPTO_1847::Tn5Km	Este trabajo
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
<i>S. meliloti</i> 1021	Sm ^r ; mutante espontáneo derivado de la cepa salvaje SU47 (Nod ⁺ , Fix ⁺)	Meade <i>et al.</i> , 1982
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Nal ^r ; <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15)</i>	Hanahan, 1983
JM109	Nal ^r ; <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
B834(DE3)	F ⁻ ; <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm met</i>	Novagen
β2163	Km ^r , Em ^r ; MG1655::Δ <i>dapA</i> ::(erm-pir)RP4-2-Tc::Mu	Demarre <i>et al.</i> , 2005
Top10	Sm ^r ; F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU, galK, rpsL endA1 nupG λ</i>	Invitrogen

1.2. Plásmidos

1.2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo

Las principales características de los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
p34S-Gm	Tc ^r ; Vector portador de un gen de resistencia a gentamicina	Denis y Zylstra, 1998
pVL33	Km ^r ; vector de expresión	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
pVL33::HA- <i>amrZ</i>	Km ^r ; contiene el gen <i>amrZ</i> fusionado en el extremo N-terminal con una hemagutina (HA)	Martínez-Granero <i>et al.</i> , 2014
pVL33:: <i>amrZ</i> -HA	Km ^r ; contiene el gen <i>amrZ</i> fusionado en el extremo C-terminal con una hemagutina (HA)	Martínez-Granero <i>et al.</i> , 2014
pBBR1-MCS2	Km ^r ; vector de clonación	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBBR1-MCS5	Gm ^r ; vector de clonación	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBluescript	Ap ^r ; vector de clonación	Stratagen
pCR-XL-TOPO	Km ^r ; vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Invitrogen
pGEM-T	Ap ^r ; vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Promega
pHP45ΩKm	Ap ^r , Km ^r ; plásmido portador del interposón ΩKm de 2.25 kb	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pJB3Tc19	Tc ^r Ap ^r ; vector de expresión de amplio espectro de huésped	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pJBpleD*	Tc ^r Ap ^r ; derivado de pJB3Tc19 que contiene un fragmento EcoRI-XbaI de 1,4 kb con el gen <i>pleD*</i> de <i>C. crescentus</i> , bajo el promotor <i>lac</i>	Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2014
pK18 <i>mobsacB</i>	Km ^r ; vector suicida	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pTYB12	Ap ^r ; vector para la expresión de proteínas	New England Biolabs
pSUP2021	Ap ^r , Cm ^r , Km ^r ; plásmido portador del transposón Tn5(Km)	Simon <i>et al.</i> , 1983
pUC18	Ap ^r ; vector de clonación	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

1.2.2. Plásmidos construidos en este trabajo

Las principales características de los plásmidos construidos en este trabajo se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos construidos en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pBBR1-MCS2:: <i>amrZ</i>	Km ^r ; plásmido derivado de pBBR1-MSC2 con un fragmento de 629 pb que contiene el gen <i>amrZ</i> flanqueado por los sitios BamHI y XbaI	Este trabajo
pBluescript:: <i>amrZ</i> -Gm	Ap ^r ; plásmido derivado de Bluescript con un fragmento PstI/HindIII de 2.207 pb que contiene el gen <i>amrZ</i> interrumpido por un casete de Gm en el sitio SphI	Este trabajo
pJB3:: <i>fleQ</i>	Ap ^r , Tc ^r ; plásmido derivado de pJB3Tc19 con un fragmento de 1.938 pb que porta el gen <i>fleQ</i> flanqueado por sitios SpeI y EcoRI	Este trabajo
pUC18:: <i>fleQ</i> ΩKm	Ap ^r ; plásmido derivado de pUC18 que contiene el gen <i>fleQ</i> interrumpido por el interposón ΩKm en el sitio NaeI	Este trabajo
pBBR1-MCS5:: <i>fleQ</i>	Gm ^r ; plásmido derivado de pBBR1-MSC5 con un fragmento de 1.962 pb que porta el gen <i>fleQ</i> flanqueado por los sitios HindIII y EcoRI	Este trabajo
pTYB12:: <i>fleQ</i>	Ap ^r ; plásmido derivado de pTYB12 con un fragmento de 1.835 pb que contiene el gen <i>fleQ</i> flanqueado por los sitios NdeI y EcoRI	Este trabajo
pK18 <i>mobsacB</i> :: <i>wssBC</i>	Km ^r ; plásmido portador de un fragmento EcoRI de 2.510 pb con los genes <i>wssABC</i> de los que se ha eliminado parte de los genes <i>wssB</i> y <i>wssC</i>	Este trabajo

pBBR1-MCS2::amrZ

Plásmido construido para complementar el mutante deficiente en *amrZ*. Porta un fragmento de 629 pb que contiene el gen *amrZ*, generado por PCR con los cebadores HindIII_1847 y R_1847 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de Pto DC3000. El producto de amplificación se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia de *amrZ*. Tras la digestión con BamHI y XbaI, el fragmento se ligó en el plásmido pBBR1-MSC2 previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante pBBR1-MCS2::*amrZ* contiene el gen *amrZ* (PSPTO_1847) de Pto DC3000.

pBluescript::amrZ-Gm

Este plásmido porta el gen *amrZ* interrumpido con un casete de Gm y se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la cepa Pto DC3000. Se amplificó una región de 1.349 pb con los cebadores HindIII_1847, que contiene el sitio HindIII, y R_1847 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de Pto DC3000. El producto de amplificación se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia de *amrZ*. Tras la digestión con HindIII y PstI, el fragmento se clonó en el plásmido pBluescript previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante, pBluescript::*amrZ* se digirió con SphI y se ligó a un casete de Gm digerido previamente con SphI a partir del plásmido p34S-Gm. El plásmido resultante, pBluescript::*amrZ*-Gm, no se replica en *Pseudomonas*, confiere resistencia a ampicilina y gentamicina, y se utilizó para el reemplazamiento génico tras su electroporación.

pJB3::fleQ

Plásmido construido para complementar el mutante deficiente en *fleQ*. Porta un fragmento de 1.938 pb que contiene el gen *fleQ*, generado por PCR con los cebadores FleQ5' y FleQ3' (Tabla 4) a partir de ADN genómico de Pto DC3000. El producto de amplificación se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia de *fleQ*. Tras digestión con EcoRI y SpeI, el fragmento se ligó en el plásmido pJB3Tc19 previamente digerido con EcoRI y XbaI. El plásmido resultante, pJB3::*fleQ*, contiene el gen *fleQ* de Pto DC3000.

pBBR1-MCS5::fleQ

Plásmido construido para complementar el mutante deficiente en *fleQ*. Porta un fragmento de 1.962 pb que contiene el gen *fleQ*, generado a partir de la digestión de pJB3::*fleQ* con las enzimas HindIII y EcoRI. El fragmento HindIII y EcoRI que contiene el gen *fleQ* fue clonado en el plásmido pBBR1-MSC5 previamente digerido con las enzimas HindIII y EcoRI. El plásmido resultante, pBBR1-MCS5::*fleQ*, contiene el gen *fleQ* de Pto DC3000.

pTYB12::fleQ

Plásmido de expresión utilizado para purificar la proteína *fleQ* fusionada a una inteína en el extremo N-terminal. Porta un fragmento de 1.835 pb que contiene el gen *fleQ* amplificado a partir del plásmido pBBR1-MCS5::*fleQ* con los cebadores Univ-F y fleQ-NdeI (Tabla 4), que añade el sitio NdeI. El producto

de PCR se digirió con las enzimas NdeI y EcoRI y se ligó al vector pTYB12 digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pTYB12::*fleQ*, que contiene el gen *fleQ* de Pto DC3000.

pUC18::*fleQ*ΩKm

Es un plásmido que porta el gen *fleQ* interrumpido con un casete ΩKm que se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la cepa Pto DC3000. Se amplificó una región de 3.232 pb con los cebadores FleQ5' y FleQ3' (Tabla 4) a partir de ADN genómico de Pto DC3000. El producto de amplificación se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia de *fleQ*. Tras la digestión con EcoRI, el fragmento se ligó en el plásmido pUC18 previamente digerido con EcoRI. El plásmido resultante pUC18::*fleQ* se digirió con la enzima NaeI y se ligó al interposón ΩKm, amplificado a partir del plásmido pHP45ΩKm con el oligonucleótido ΩKmEco47III y digerido con Eco47III. El plásmido resultante pUC18::*fleQ*ΩKm, vector suicida en *Pseudomonas*, porta resistencia a ampicilina y kanamicina y se utilizó para el reemplazamiento génico.

pK18*mobsacB*::*wssBC*

Plásmido que porta un fragmento de 2.510 pb con los genes *wssABC* de los que se han deleciónado parcialmente *wssB* (1.588 pb) y *wssC* (1.008 pb), los genes *wssBC* deleciónados se utilizaron para reemplazar los genes silvestres en la cepa Pto DC3000. La construcción se llevó a cabo mediante PCRs solapantes. Por una parte, se amplificó un fragmento de 1.192 pb con los cebadores 1026_F y 1027_R y, por otra parte, se amplificó un fragmento de 1.311 pb con los cebadores 1028-F y 1029-R (Tabla 4). Los dos productos de amplificación se purificaron y utilizaron como ADN molde para una nueva PCR realizada con el par de cebadores externos (1026_F y 1029_R). Así se obtuvo una región de 2.492 pb que se clonó en el vector PCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia. Tras digestión con EcoRI, el fragmento se ligó en el plásmido pK18*mobsacB* digerido también con EcoRI, generando así el plásmido pK18*mobsacB*::*wssBC*. Este vector es suicida en *Pseudomonas*, proporciona resistencia a kanamicina y sensibilidad a sacarosa y se utilizó para el reemplazamiento génico.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos de PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
U21 (universal) R21 (reverso)	GTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	Cebadores utilizados para verificar y secuenciar los fragmentos clonados en los vectores pGEM-T, PCR-XLTOPO, pK18 <i>mobsacB</i> y pUC18
Kmout	GCATTAATCTAGCGAGGG	Cebador utilizado para verificar la orientación del interposón ΩKm
pJB3Tc19_F pJB3Tc19_R	GCCTCTTCGCTATTACGCC TGTGTGGAATTGTGAGCGG	Cebadores utilizados para verificar los fragmentos clonados en el vector pJB3Tc19
Tn5_F Tn5_R	AAAGTTCCGTTCCAGGACGC TCCC GTTTCCAGGATCTG	Cebadores utilizados para secuenciar los genes interrumpidos por el transposón Tn5
HindIII_F_1847 R_1847	TGTTAAGCTTGTATCGGGTTGTCGCT ATGAACGGGCAGCAACAG	Amplifican una región de 1.348 pb que incluye el gen <i>amrZ</i> , generando un sitio de corte para <i>HindIII</i>
3' <i>amrZ</i> 3'Km	GGTGC GTTGTAGTGATGC CAGTCATAGCCGAATAGCC	Cebadores utilizados para verificar la orientación del transposón Tn5 en el gen PSPTO_1847. Amplifica un fragmento de 1.808 pb
FleQ5' FleQ3'	GGGCATCAAGACCCAGCAG CCAAGCGCTCTTTCTCTGCC	Amplifican una región de 3.252 pb que incluye la segunda mitad del gen <i>fliD</i> , los genes <i>fliS</i> , <i>fleQ</i> y la primera mitad del gen <i>fleS</i>
FleQ-F FleQ-R	ATCGATGACGATAGCCAGC CTCTGCGTCTTGTACTGC	Cebadores utilizados para verificar la presencia del casete de Km en el gen <i>fleQ</i>
U21 (universal) fleQ-NdeI	AGTAAAACGACGGCCAGT TAACGTCCATATGTGGCGTGAATCAAG	Cebadores utilizados para purificar la proteína <i>fleQ</i> . Amplifican un fragmento de 1.835 pb, generando un sitio de corte NdeI
1026_F 1027_R	CGACACGCAGTTGTTGGC GCCAGTTCGCCTGCTCGCAGAACTCGC	Cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 1.192 pb que incluyen parte del gen <i>wssA</i> y parte del gen <i>wssB</i>
1028_F 1029_R	GCGAGCAGGCGAACTGGCTGCCGAGTG CGGTCATCCAGCCAACAG	Amplifican una región de 1.311 pb que incluye parte del gen <i>wssE</i> y parte del gen <i>wssF</i>

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1. Medios

Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min. Algunas soluciones se esterilizaron por filtración, utilizando filtros estériles de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de poro.

2.1.1. Medios ricos

El cultivo habitual de las distintas cepas de Pto y de *E. coli*, se realizó en el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). Para la preparación de medios sólidos en placas de Petri, se añadió bacto-agar a una concentración final del 1,5% (p/v). Los ensayos de movilidad bacteriana tipo *swimming* se llevaron a cabo en medio LB semisólido y los ensayos de movilidad tipo *swarming* en medio PG-Agar (Matilla *et al.*, 2007). La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de medios utilizados en este estudio

Medio	Composición	
Medios ricos		
LB	Bactotripton	10 g
	Extracto de levadura	5 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	1 L
	Ajustar a pH 7,0	
LB sólido	Medio LB Agar bacteriológico	15 g/L
LB semisólido	Medio LB Agar bacteriológico	3 g/L
Medio PG-Agar	Proteosa-peptona No.3 (Difco 211693)	5 g
	Glucosa	2 g
	Bacto-agar (Difco 214010)	5 g
	Agua destilada	hasta 1 l
Medio 2xYT	Bactotripton	16 g
	Extracto de levadura	10 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	hasta 1 l
Medios mínimos		
MMF	Tampón fosfato potásico, pH 5,7	50 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 mM
	MgCl ₂	1,7 mM
	NaCl	1,7 mM
	Fructosa	10 mM
MMR	K ₂ HPO ₄	1.31 mM
	KH ₂ PO ₄	2.2 mM
	MgSO ₄	0.61 mM
	CaCl ₂	0.34 mM
	FeCl ₃	0.022 mM
	NaCl	0.85 mM
	Glutamato sódico	7 mM
	Manitol	55 mM

2.1.2. Medios mínimos

En algunos ensayos se utilizó un medio mínimo denominado MMR o un medio inductor del sistema de secreción tipo 3 denominado MMF que simula la composición del apoplasto vegetal (Huynh *et al.*, 1989). Las soluciones madre empleadas para estos medios se prepararon por separado y se esterilizaron en el autoclave. Las composiciones se detallan en la Tabla 5.

2.2. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones mil veces concentradas en agua destilada (H₂O_d), excepto el cloranfenicol, que se preparó en etanol, y la rifampicina y tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración y se almacenaron en pequeñas alícuotas a -20°C. Las concentraciones finales (en µg/ml) de los antibióticos precisados en los diferentes protocolos se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Antibióticos utilizados en este estudio

Antibiótico	Cepas de <i>E.coli</i>	Cepas de Pto
Ácido nalidíxico (Nal)	10	-
Ampicilina (Ap)	100	250
Cloranfenicol (Cm)	30	30
Gentamicina (Gm)	10	10
Kanamicina (Km)	50	50
Rifampicina (Rif)	-	10
Tetraciclina (Tc)	10	10

2.3. Condiciones de cultivo

Para el crecimiento habitual en el laboratorio las estirpes de *P. syringae* y de *E. coli* se utilizó el medio rico LB a 28°C y 37°C, respectivamente. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación de 200 rpm en un incubador orbital Kuhner ISF-4-W (Adolf Kühner AG).

2.4. Conservación de los cultivos bacterianos

La conservación prolongada de los cultivos bacterianos se realizó por congelación. Este método se basa en la paralización del metabolismo celular al disminuir la disponibilidad de agua. Para que la viabilidad celular se mantenga durante el periodo de conservación es necesario adicionar un crioprotector que evita el daño que los cristales de agua ocasionarían en las paredes celulares. En nuestro caso se escogió glicerol, que se utilizó a una concentración de 30% (v/v). Así, a 450 µl de glicerol 60% (v/v) estéril dispuesto en criotubos, se le añadieron 450 µl de cultivo bacteriano crecido hasta fase exponencial tardía. Los viales se congelaron rápidamente una temperatura de -80°C.

2.5. Transformación bacteriana

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

La preparación de células competentes de *E. coli* para su posterior transformación por choque térmico se realizó con el método de Nishimura *et al.* (1990). A partir de un cultivo fresco en caja de Petri, la cepa

correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C durante 12-14 h en agitación. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A [LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y glucosa 0,2% (p/v)] y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO₆₆₀ = 0,4 - 0,6). A partir de ese momento las células se mantuvieron siempre en frío para obtener la mayor eficiencia de transformación. Las células se mantuvieron durante 10 min en hielo y se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C) a la que se añadieron 2,5 ml de solución B (LB suplementado con glicerol 36% (v/v); polietilenglicol-8000, 12% (p/v) y MgSO₄ 12 mM) fría (4°C). Finalmente, la suspensión bacteriana se repartió en alícuotas de 125 µl que se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso. Las soluciones A y B se conservaron a 4°C tras esterilizarlas por filtración.

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

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Una alícuota de la suspensión celular almacenada a -80°C se descongeló en hielo, se le añadieron entre 10 y 50 ng de ADN plasmídico mezclando suavemente mediante agitación manual y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 1 min y se incubó en hielo durante 2 min. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante al menos 1 h a 37°C con agitación para permitir la expresión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al(los) antibiótico(s), se seleccionaron sembrando entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 h.

En los casos en que los vectores permitían selección blancas/azules, se añadió también a las placas de LB 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal, 20 mg/ml en formamida) a una concentración final de 20 µg/ml, y 1-isopropil-β-D-1-galactopiranosido (IPTG, 100 mM en agua desionizada estéril) a una concentración final de 100 µM.

2.5.3. Preparación de células electrocompetentes

La electroporación es el método más utilizado para transferir ADN plasmídico a las cepas de *Pseudomonas*. Para llevarlo a cabo, es necesario que las células sean electrocompetentes y se precisa la eliminación de las sales del medio de cultivo, de manera que no interfieran con la electroporación.

La preparación de células competentes de Pto DC3000 para electroporación se realizó mediante el método descrito por Choi *et al.* (2006). A partir de un cultivo de 12-16 h crecido a 28°C en LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, se recuperaron las células de 4 ml de cultivo por centrifugación a máxima velocidad durante 2 min. El sedimento celular, se lavó dos veces con 1 volumen de sacarosa 300 mM estéril a temperatura ambiente. Tras el último lavado, las células se resuspendieron en un volumen de 100 µl de sacarosa 300 mM y se mantuvieron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico.

2.5.4. Electrotransformación

A la suspensión celular se le añadió el ADN plasmídico libre de sales (entre 10 y 50 ng de ADN para plásmidos replicativos y entre 300-500 ng de ADN para plásmidos suicidas), se mezcló suavemente y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de anchura previamente enfriada, donde recibieron un pulso eléctrico de 2,5 kV en un electroporador modelo 2510 (Eppendorf). Tras el pulso, las células se recuperaron inmediatamente añadiendo 1 ml de LB a temperatura ambiente y se incubaron durante 2 h a 28°C con agitación. Finalmente, se sembraron entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en medio selectivo para los transformantes.

2.5.5. Selección de intercambio alélico y cointegración

Los mutantes de pérdida de función de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante la técnica de reemplazamiento génico, utilizando los plásmidos pUC18::*fl*eQQKm y pBluescript::*amrZ-Gm*, en los que se clonó el gen a mutar interrumpido por el casete de Km y Gm, respectivamente, de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, al menos 1 kb, a cada lado del casete del antibiótico para permitir la recombinación homóloga. Los plásmidos usados para la mutagénesis, derivados de pUC18 y pBluescript respectivamente, no se replican en *Pseudomonas*.

El plásmido pUC18::*fl*eQQKm, con resistencia a ampicilina y kanamicina, y el plásmido pBluescript::*amrZ-Gm*, con resistencia a ampicilina y gentamicina, se electroporaron en Pto DC3000. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con kanamicina o gentamicina, respectivamente, y se comprobó el crecimiento de las colonias Km^r y Gm^r en placas de LB suplementadas con ampicilina (250 µg/ml) para determinar si cada transformante era el resultado de un único evento de recombinación (integración plasmídica, Ap^r) o de un doble evento de recombinación (intercambio alélico, Ap^s). Los mutantes deficientes en los genes de interés se confirmaron mediante PCR.

3. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas básicas de manipulación y análisis de ADN como digestión por enzimas de restricción o ligación se realizaron según los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) y de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

3.1. Aislamiento de ADN

3.1.1. Minipreparaciones de plásmidos

Para la obtención de ADN de alta pureza, necesario en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial *Plasmid Miniprep kit* (BIO-RAD, ref 732-6100) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cualquier caso, se partió de 3-5 ml de un cultivo en medio LB de la cepa portadora con los antibióticos necesarios incubado a temperatura óptima y en agitación durante 14-16 h.

3.1.2. Aislamiento de ADN genómico

Para la preparación de ADN total se utilizó el sistema comercial *Wizard-Genomic DNA purification kit* (PROMEGA, ref. A1120) siguiendo las instrucciones del fabricante y partiendo de 4 ml de cultivo en LB.

3.2. Electroforesis de ADN

3.2.1. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de ADN se llevó a cabo utilizando geles de agarosa preparados en tampón TAE (Tris-base, 4,84 g; ácido acético glacial, 1,14 ml; EDTA 0,5 M pH 8,0, 2 ml y H₂O hasta 1 litro) o TBE (Tris base, 10,6 g; ácido bórico, 5,5 g; EDTA 0,5 M pH 8,0, 4 ml y H₂O hasta 1 litro) (Sambrook *et al.*, 1989), usando como patrón de peso molecular el marcador comercial X (Roche Molecular Biochemicals, ref. 11498037001).

3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para técnicas que precisan una buena resolución de las bandas, se utilizó la electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizantes por la adición de urea 7 M. La separación de las cadenas de ADN marcadas radiactivamente se realizó por electroforesis en un gel de secuenciación desnaturalizante (urea 7 M) con poliacrilamida al 6,5% (p/v) preparado en tampón Tris-Borato-EDTA [TBE, (Tris 50 mM, EDTA-Na₂ 2,5 mM, BO₃H₂ 50 mM, pH 8,2)] según Sambrook *et al.* (1989). A 60 ml de solución de poliacrilamida desnaturalizante (80 ml de TBE 5x; 86,6 ml de solución 30% de acrilamida-bisacrilamida 29:1(Bio-Rad); 168 g de urea; y H₂O hasta 0,4 L), se añadieron 250 µl de persulfato amónico 10% (p/v) y 75 µl de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) para catalizar la polimerización de la acrilamida. El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis se realizó conforme a las instrucciones del fabricante y una de ellas se trató con dimetildiclorosilano para evitar la adhesión del gel a la misma. Antes de cargar las muestras, el gel se corrió previamente a potencia fija de 40 W durante 45 min o hasta adquirir una temperatura de aproximadamente 50°C. Durante la pre-corrida del gel se prepararon las muestras, ya que es importante que estén desnaturalizadas antes de cargarlas.

A las muestras resuspendidas en TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) se le añadieron 2 µl de tampón de carga desnaturalizante (0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,3% (p/v) xilencianol; 10 mM EDTA, pH 8,0; 97% (p/v) formamida desionizada), se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 5 min y posteriormente se enfriaron en hielo.

La electroforesis se realizó en tampón TBE a potencia fija de 40 W (≈1.700 V) durante 2 h aproximadamente. Tras la electroforesis, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM por adhesión, se cubrió con una película de plástico transparente y se secó al vacío a 80°C durante 20 min utilizando el sistema Gel Dryer 583 (Bio-Rad). Las bandas de ADN se visualizaron por exposición en pantallas BAS-IP MS2040 (Fuji) utilizando un equipo *Phosphor Imager Personal FX* (Bio-Rad). La cuantificación de la intensidad de las bandas analizadas se realizó con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad) suministrado con el equipo.

3.2.3. Marcadores de peso molecular

El tamaño de los fragmentos de ADN en geles de agarosa se estimó por comparación con diferentes marcadores de peso molecular comerciales:

- Marcador II: ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII. Se compone de 8 fragmentos que abarcan desde los cientos de nucleótidos hasta más de 20 Kb. También se dispone marcado con digoxigenina que marcan el peso molecular en las hibridaciones ADN-ADN.
- Marcador VIII (Roche): ADN del plásmido pUCBM21 digerido con las enzimas de restricción *Hpa*II y *Dra*I más HindIII. Se compone de 18 fragmentos en un rango de 19 a 114 pb.
- Marcador X (Roche): Es una mezcla que contiene un fragmento de 1.018 pb derivado del plásmido 2 μ *Saccharomyces cerevisiae*, los multímeros de este fragmento y productos de restricción del plásmido pBR322.

Para los geles de poliacrilamida desnaturalizantes se llevaron a cabo reacciones de secuenciar con dimetilsulfato (DMS) por el método de Maxam&Gilbert, que proporciona una escalera de Gs. Se empleó el fragmento wssA1, que se obtuvo por PCR utilizando los mismos cebadores que para el ensayo de retardo en gel (apartado 5.6.1.), con la diferencia de que sólo uno de ellos (wssA-R) fue previamente marcado radiactivamente por fosforilación con PNK y [γ 32 P]-ATP (ver apartado 5.6.2.).

A 20 nM de PCR se añadieron 4 μ l de DMS diluido al 1,5 % (v/v) en tampón de unión (Tris-acetato 25 mM pH 8,0; acetato magnésico 8 mM; KCl 10 mM; polietilenglicol 8000 3,5% (p/v) y DTT 5 mM). Tras incubar 2 min a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 20 μ l de solución DMS Stop (acetato amónico 2,5 M; β -mercaptoetanol 1 M; EDTA 1 mM; ARN_t 100 μ g/ml). El ADN se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y se precipitó a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y tres volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó 15 min a 12.000 g y el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 60 μ l de agua milliQ y se trató con piperidina al 10% (v/v) durante 30 min a 90°C. Al finalizar la incubación, las muestras se congelaron en N₂ líquido y, para eliminar cualquier resto de piperidina del ADN tratado, se realizaron varias extracciones con butanol. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 10 μ l de TE para su posterior análisis por electroforesis.

3.3. Determinación de la concentración de ADN

Se han empleado dos métodos para determinar la concentración de una solución de ADN. En primer lugar, utilizando el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad), un espectrofotómetro UV-visible que permite cuantificar rápidamente ADN, ARN, ácidos nucleicos marcados y proteínas en un limitado volumen de muestra (1-2 μ l). Como segunda opción, se ha empleado el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) consistente en la comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida.

3.4. PCR

La reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR), fue el método usado para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *Pto*, de plásmidos portadores de genes o regiones de interés y para el análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones, con el fin de detectar de forma rápida el ADN insertado. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,5 ng de ADN cromosómico o 10 ng de ADN plasmídico), oligonucleótidos (0,5 μ M cada uno), tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs (50 μ M de cada uno) y *Taq* ADN-polimerasa (Amersham Pharmacia, ref. 27079902) (0,02 U). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: en primer lugar, tras la desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se realizaron entre 30 ciclos con el siguiente programa: 45 seg a 94°C; 45 seg a 55°C y 1 min/kb a 72°C, para finalmente realizar una extensión final a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación se ajustó en función de los cebadores utilizados.

3.4.1. PCR de colonia

Es una estrategia rápida para la identificación de un plásmido o colonia recombinante de entre un conjunto de candidatos potenciales a partir de las colonias en placa. Con *E. coli* se reparten los 15-20 μ l de la mezcla de reacción de PCR y, en lugar de poner el ADN molde, se pica directamente una colonia de la placa en esterilidad usando un palillo, agitando dentro de la mezcla y sometiendo a continuación a un programa de PCR estándar. Con *Pto* se utilizaron 2 μ l de lisado de colonia como molde para la PCR.

3.5. Clonaje de fragmentos

En este apartado se incluyen distintos protocolos utilizados habitualmente para el clonaje de insertos de interés en vectores.

3.5.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, del proveedor (Roche y New England Biolabs Inc). Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura; en caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando fue necesario la enzima de restricción se inactivó por calor o por purificación del ADN tras la electroforesis en gel de agarosa.

3.5.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

3.5.2.1. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa utilizando kit

El aislamiento de fragmentos de restricción y de productos de amplificación obtenidos mediante PCR, separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa se realizó con el sistema comercial *QIAquick*

PCR Purification Kit (Qiagen, ref. 28708) siguiendo las instrucciones del fabricante y tras teñir el gel por inmersión en una solución de GelRed (Biotium, 100U/L).

3.5.2.2. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa mediante electroelución

Para el aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa con el fin de hacer PCR o secuenciarlos, se utilizó el método de electroelución con membrana de diálisis previamente tratada a 120 V durante 20 min e invirtiendo la polaridad a 80 V por 1 min (Sambrook *et al.*, 1989).

Se utilizaron geles de agarosa preparados en TBE y para eluir el ADN de la banda se utilizaron 400 ml de TBE. El ADN presente se precipitó añadiendo 0,1 volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó 30 min a -80°C y se concentró por centrifugación a 12.000 g durante 15 min. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12.000 g durante 5 min, tras lo cual se dejó secar antes de resuspenderlo en H₂O milliQ.

3.5.3. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La unión covalente de dos moléculas de ADN lineal se lleva a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Roche). La proporción molar más habitual vector:inserto suele ser 1:3, aunque puede variar dependiendo del tamaño de los fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10-15 µl y a 14-16°C durante toda la noche.

3.5.4. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de las construcciones presentadas en este trabajo se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada. Al ADN a secuenciar (0,2-1 µg) se le adicionó el cebador específico (6,4 picomoles) y agua milliQ hasta un volumen final de 12 µl. Este servicio de secuenciación amplifica las muestras con la polimerasa Amplitaq FS en un termociclador Perkin Elmer 9.600 y las secuencia en un secuenciador ABI 373 XL Stretch (Perkin-Elmer) usando el sistema comercial ABI PRISM Big Dye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer).

Las secuencias se visualizaron con el programa Chromas Lite 2.01. Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con el programa informático Clone Manager (Sci Ed Central). La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en las bases de datos se realizó con los distintos algoritmos del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1998) disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). El alineamiento de secuencias se realizó con el paquete informático Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), y para su visualización se utilizó el programa BioEdit 7.0.5.3. Los datos sobre el genoma de Pto DC3000 y de otros genomas se consultaron en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

4. Técnicas de manipulación de ARN

La purificación y manipulación de ARN requiere de material y reactivos libres de ribonucleasas, por lo que en la preparación de los reactivos y soluciones se utilizó siempre H₂O_d tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Para ello, a 1 litro de H₂O_d se añadió 0,1% (v/v) de DEPC y se dejó en agitación durante 1 h. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

4.1. Aislamiento de ARN

Con objeto de paralizar lo más rápidamente posible el metabolismo bacteriano, las muestras se recogieron y centrifugaron muy rápidamente. A partir de un cultivo crecido en LB, MMR o MMF a la densidad óptica y condiciones de interés, se tomaron alícuotas de 10 ml para DO₆₆₀ = 0,5 y DO₆₆₀ = 1 y de 1,5 ml para DO₆₆₀ = 1,5 en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 3 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para el aislamiento de ARN total de Pto DC3000 y sus mutantes se empleó el reactivo TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Inc). Las células almacenadas a -80°C se sacaron en hielo, a cada tubo se le añadió 1,5 ml de la solución TRI Reagent precalentada a 70°C, se resuspendieron por pipeteo y los tubos se incubaron durante 10 min a 65°C. Pasado este tiempo se centrifugaron (12.000 g, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos, a los que se añadieron 0,1 volúmenes de BCP (1-bromo-3-cloropropano) y se mezclaron agitándolos vigorosamente durante 30 seg. Los tubos se incubaron 5 min a temperatura ambiente para que se separaran las fases. Se centrifugaron nuevamente (16.000 g, 15 min, 4°C), la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el ARN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugaron de nuevo (12.000 g, 8 min, 4°C). Tras descartar el sobrenadante, las muestras se lavaron con 1 ml de etanol 70% (v/v) en H₂O DEPC y se centrifugaron (12.000 g, 5 min, 4°C). Tras eliminar el sobrenadante y dejar los tubos abiertos secando a 30-37°C durante 15 min, el precipitado se resuspendió en 80 µl de H₂O tratada con DEPC a 50°C durante 5-10 min. Finalmente, el ARN se almacenó directamente a -80°C o se realizó el tratamiento con DNasa I.

4.2. Tratamiento con DNasa I

Para eliminar los restos de ADN contaminante en las preparaciones de ARN, las muestras se trataron con DNasa I libre de RNAsas (Qiagen). A 80 µl de ARN se añadieron 14 µl de tampón 10xRDD y 6 µl de DNasa I (1500 Unidades Kunitz) en un volumen final de 140 µl. Se digirió durante 1 h a 28°C (la incubación podría alargarse media h más).

Tras el tratamiento con DNasa, las muestras se limpiaron con el sistema comercial *RNeasy Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó dos veces, añadiendo 35 µl de H₂O libre de RNAsas (Qiagen), incubando durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugando a velocidad máxima 1 min. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a -80°C en caso de no seguir con la síntesis de ADN (ADNc).

4.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total

La integridad del ARN total extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (p/v). La concentración de ARN y la pureza de la extracción (contaminación de proteínas y/o fenol) se midieron de manera equivalente al ADN (previa dilución en H₂O DEPC) en el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad) utilizando el factor para ARN, ya que la concentración se calcula a partir de la DO₂₆₀ (1 unidad de DO₂₆₀ = 40 µg/ml de ARN). La relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ se usó para estimar la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

4.4. PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADNc se realizaron utilizando el sistema comercial *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante 30 min. Posteriormente, se amplificaron mediante una reacción de PCR en las siguientes condiciones: tras una incubación de 4 min a 95°C, se realizaron 30 ciclos (20 seg a 95°C, 20 seg a 57°C, 35 seg a 68°C), para finalmente extender a 65°C durante 7 min. En todos los ensayos se llevaron a cabo controles negativos para detectar posibles falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Dicho control negativo consistía en una reacción de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa, es decir, únicamente en presencia de Taq polimerasa. Las secuencias de los cebadores utilizados en estos ensayos para el análisis de los genes *wssABCDEFGHI* se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en las RT-PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
1026_F	CGACACGCAGTTGTTGGC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssA</i> y <i>wssB</i> se co-expresan
wssB_R	ACCAGTGCCATCAGCAGC	
wssB_F	GAAGTGGTACGCCTGACG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssB</i> y <i>wssC</i> se co-expresan
wssC_R	GCACGTTGAAGTTGACGC	
wssC1_F	CAACGACACAGTCAGCC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssC</i> y <i>wssD</i> se co-expresan
1029_R	CGGTCATCCAGCCAACAG	
wssD_F	CGTTGCTGCCGTAATTCC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssD</i> y <i>wssE</i> se co-expresan
wssE2_R	CCCCGGTGCCTTGTCAC	
wssE_F	GAGCTTCTATGCCATCGGC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssE</i> y <i>wssF</i> se co-expresan
wssF_R	CACCACCAGATCAGGCTTG	
wssF_F	CAAGCCTGATCTGGTGGTG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssF</i> y <i>wssG</i> se co-expresan
wssG_R	CCTTGAACACATCAGCCG	
wssG1_F	GTTTCGATTAATCCAGTGAG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssG</i> y <i>wssH</i> se co-expresan
wssG1_R	CCAAGTCCGATCAACAGAAC	
wssB_F	GAAGTGGTACGCCTGACG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssB</i> , <i>wssC</i> y <i>wssD</i> se co-expresan
1029_R	CGGTCATCCAGCCAACAG	
wssE_F	GAGCTTCTATGCCATCGGC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssE</i> , <i>wssF</i> y <i>wssG</i> se co-expresan
wssG_R	CCTTGAACACATCAGCCG	
wssF_F	CAAGCCTGATCTGGTGGTG	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssF</i> , <i>wssG</i> y <i>wssH</i> se co-expresan
wssG1_R	CCAAGTCCGATCAACAGAAC	
wssE_F	GAGCTTCTATGCCATCGGC	Pareja de oligonucleótidos utilizada para determinar si los genes <i>wssE</i> , <i>wssF</i> , <i>wssG</i> y <i>wssH</i> se co-expresan
wssG1_R	CCAAGTCCGATCAACAGAAC	

4.5. Extensión reversa a partir de un cebador (*primer extension*)

Esta técnica se emplea de forma rutinaria para detectar sitios de inicios de transcripción y consiste en mezclar un ARNm problema con un exceso de oligonucleótido complementario a una región cercana al supuesto extremo 5' o a aproximadamente 50 pb por debajo del primer ATG del ORF. Este oligonucleótido marcado radiactivamente será utilizado como cebador por una reverso transcriptasa producirá un ADNc cuya longitud debe permitir la localización del extremo de la molécula de ARNm.

4.5.1. Marcaje de cebadores

El marcaje de los oligonucleótidos se realizó por fosforilación en su extremo 5'. La reacción, catalizada por la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK, Roche), permite la incorporación de un fosfato marcado radiactivamente situado en posición γ de una molécula de ATP, al extremo 5'-OH del cebador. Se marcaron entre 10-20 pmoles de oligonucleótido en un volumen final de 10 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 5 mM; EDTA 0,1 mM; espermidina 0,1 mM), 1 μ l de [γ -³²P] ATP (6000 mCi/mmol) y 1 U de PNK. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, la enzima se inactivó durante 10 min a 70°C y se añadieron 10 μ l de H₂O DEPC antes de pasar el volumen resultante por una columna *Micro Bio-Spin 6* (Bio-Rad) para eliminar el exceso de ATP radiactivo. El marcaje del oligonucleótido marcado se cuantificó utilizando un contador de centelleo TRI-CARB 1500 *Liquid Scintillation Analyzer* (Packard).

4.5.2. Hibridación y extensión reversa a partir de cebador

Como cebador complementario a las cadenas de ARNm del operón *wssABCDEFGHI* se utilizó el oligonucleótido *wssA-R* (5'-CGTCAGCAGACTCATTC-3'), que hibrida con secuencias próximas al extremo 5' del gen *wssA*, solapando con su ATG.

Para la hibridación se mezclaron 20 μ g de ARN total, 1,5 μ l del cebador marcado (~200.000 cpm), 2 μ l de tampón de hibridación 5x (Tris-HCl 1M, pH 7,6; MgCl₂ 100mM; DTT 160 mM) y H₂O DEPC hasta 10 μ l. La mezcla se incubó 5 min a 90°C para la destrucción de posibles estructuras secundarias, 5 min a 65°C para la hibridación y se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar 44°C.

La extensión usando el cebador *wssA-R* se inició añadiendo 40 μ l de una mezcla de extensión que contenía 1 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 20 U de inhibidor de RNasas (Roche) y 8 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV, Roche) en tampón de extensión (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; MgCl₂ 8 mM; KCl 30 mM; DTT 1 mM). Las reacciones se incubaron 1 hora a 44°C y se detuvieron añadiendo 5 μ l de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y 150 μ l de etanol absoluto frío. Los ácidos nucleicos se precipitaron a -20°C, se centrifugaron 15 min a 12.000 g y el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 4 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) y 2 μ l de tampón de carga (0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,3% (p/v) xilencianol; 10 mM EDTA; 97,5% (p/v) formamida desionizada). Para analizarlas por electroforesis, las muestras se desnaturalizaron y se cargaron en geles de poli(acrilamida) desnaturalizantes (apartado 3.2.2.).

4.6. Cuantificación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (qRT-PCR)

4.6.1. Diseño de los oligonucleótidos

Las secuencias de los genes para el diseño de los cebadores específicos para cada transcrito se obtuvieron en www.pseudomonas-syringae.org/pst_home.html. El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Oligo 6.1.1/98 (Molecular Biology Insights) siguiendo las recomendaciones descritas en Pueyo *et al.* (2002). Como características generales, los cebadores se diseñaron para amplificar un producto de entre 100 y 200 pb, evitando la formación de estructuras secundarias y amplificaciones inespecíficas. Los cebadores seleccionados tenían valores de T_m altos ($\geq 80^\circ\text{C}$ y con diferencias menores a 1°C entre los miembros de una misma pareja) y valores óptimos de $3'\Delta G$ (≥ -8 kcal/mol).

4.6.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN

La síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) a partir de las muestras de ARN se realizó con la enzima transcriptasa reversa de Invitrogen SuperScript™ II RT siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción inicial contenía 1 μg de ARN total, 100 ng de hexámeros aleatorios (Roche), 0,5 mM de cada uno de los dNTPs y H₂O milliQ estéril (hasta 10 μl). Esta mezcla se incubó 5 min a 65°C , 10 min a temperatura ambiente y 1 min en hielo. Posteriormente a temperatura ambiente, se añadieron 10 μl de una mezcla de extensión que contenía 4 U/ μl de inhibidor de RNasa, 10 mM de DTT y 24 U/ μl de enzima SuperScript™ II RT en tampón de extensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM). La mezcla se incubó a 25°C durante 10 min, para luego realizar la reacción de transcripción reversa a 42°C durante 2 h. Al finalizar, la enzima se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 min.

4.6.3. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando fluorescencia, lo que permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación de los genes diana. El número de copias del ADN molde al inicio de la reacción se puede cuantificar con precisión a través del ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, es posible comparar las muestras y determinar la cantidad de transcrito bajo las condiciones de interés.

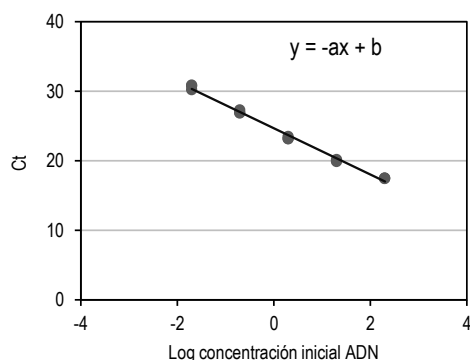
La amplificación de los fragmentos de ADNc para la cuantificación de los niveles de transcritos iniciales se realizó en un termociclador iCycler iQ2 de Bio-Rad y en un volumen final de 25 μl que contenía: ADNc (50 ng), oligonucleótidos específicos para cada gen (300 nM) y una mezcla que viene comercialmente preparada 2x iQ SYBR™ Green Supermix que contiene dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I, fluoresceína y ADN polimerasa iTaq. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 min, 40 ciclos de dos pasos cada uno [desnaturalización (95°C , 20 seg) y apareamiento de los cebadores y extensión (70°C , 30 seg)]. Tras la amplificación, las

condiciones para obtener la curva de fusión o curvas de *melting* fueron 95°C durante 1 min, seguido por 30 ciclos de 10 seg, iniciando a 95°C y disminuyendo 1°C por ciclo hasta 66°C.

4.6.4. Determinación de la eficiencia de los cebadores

La eficiencia de las amplificaciones obtenidas mediante PCR en tiempo real a partir de cada pareja de cebadores puede calcularse realizando una curva patrón. Dicha curva se obtiene representando el logaritmo del número inicial de moléculas frente al número mínimo de ciclos de PCR necesarios para observar amplificación partiendo de esa cantidad de transcrito (ciclo umbral, Ct). En nuestro caso, cuantificando el ARN inicial y suponiendo una eficiencia del 100% en la síntesis del ADNc se realizaron diluciones seriadas entre 200 ng y 0,02 ng de muestra por reacción. De esta manera se correlacionó la cantidad inicial de transcrito y el Ct obtenido para cada dilución.

Durante la fase exponencial de la PCR en tiempo real la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo. Por ello, la diferencia entre los valores de Ct de cada dilución está determinada por la ecuación $2^n = \text{factor de dilución}$, donde n es el número de ciclos de diferencia. Si el factor de dilución es 10, entonces $n=3,32$ y los valores de Ct deberían estar separados cada 3,32 ciclos. La eficiencia de la amplificación E, se calcula a partir de la pendiente de la curva patrón utilizando la fórmula:



$$E = 10^{-1/a} - 1$$

E = eficiencia de los oligonucleótidos

A = pendiente de la recta de regresión

Si la cantidad de producto de PCR se duplica exactamente en cada ciclo, E es igual a 1.

4.6.5. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias

Después de cada reacción de PCR cuantitativa se analizó la curva de fusión o de *melting*. Esta curva se produce como consecuencia del descenso de la señal fluorescente del producto de PCR formado debido a la fusión dependiente de temperatura del producto amplificado y se obtiene mediante la relación entre la derivada de la fluorescencia y la temperatura. La derivada revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). Los productos específicos de una pareja de cebadores deben presentar el pico máximo de la curva de fusión a la misma temperatura. Si se produce una amplificación inespecífica, este pico estaría desplazado respecto al obtenido a partir del producto específico. Si se amplifica más de un fragmento a partir de una pareja de cebadores, la curva presentaría picos múltiples a temperaturas diferentes. Para nuestro análisis sólo se consideraron las muestras cuyos productos presentaban curvas de fusión homólogas.

4.6.6. Cálculo de la expresión relativa

El cálculo de la expresión relativa a partir de los datos de la PCR en tiempo real se hizo mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). Tras la transcripción reversa se amplificaron por PCR cuantitativa los transcritos correspondientes al gen de estudio y al gen de referencia utilizando sus respectivas parejas de cebadores específicos. En nuestro caso, utilizamos como gen de referencia *gyrA*, que codifica para la subunidad A de la ADN girasa, ya que no modificaba su expresión. La expresión de cada gen relativa a *gyrA* se calculó a partir de la diferencia entre las Cts obtenidas con sus cebadores respectivos ($\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct_{gyrA}$) en la misma muestra de ADNc. La expresión de cada gen comparado con el tratamiento control ($\Delta\Delta Ct$) se determinó a partir de la diferencia entre los ΔCt s obtenidos con los mismos cebadores y sus correspondientes muestras de ADNc. Dado que un ciclo de PCR representa una diferencia de dos veces en la abundancia del templado y por lo tanto del número de transcritos iniciales, los valores de inducción se calcularon como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.6.7. Oligonucleótidos utilizados para PCR cuantitativa

Se muestran en la Tabla 8 las secuencias de los oligos empleados para la amplificación y cuantificación de los genes de interés, que se diseñaron teniendo en cuenta las pautas descritas en la sección 4.6.1.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por qRT-PCR

Gen	Producto (pb)	Secuencia (5' → 3')	Ecuación curva de eficiencia (coeficiente de correlación)	Eficiencia
<i>amrZ</i>	109	GCAAGTTCCTGTCATGG (F) GTCCTGAGCTGTCCTTGC (R)	$y = -3,420x + 23,806$ (0,99)	1,00
<i>fleQ</i>	134	GCGAGAGTTCTGTGCGTGCTGGTC (F) GCAGCTCGACGGAAGAGTTTTCGCTCA (R)	$y = -3,311x + 36,286$ (0,98)	1,00
<i>gyrA</i>	205	GGCAAGGTCACCCGCTTCAAGGAAT (F) GACCGCCACGCTTGTACTCAGGGAAC (R)	$y = -3,329x + 24,675$ (0,99)	1,00
<i>hrpA</i>	154	TGCACAAGCCAAGGCCAGTAAAGAGTCC (F) TCGCTGTGGCACTGATCTTCTTGTGGT (R)	$y = -3,311x + 23,858$ (0,99)	1,00
<i>hrpL</i>	138	CAAACCGCAGACCTGGCTGTGTGG (F) TGACTGACATCACCGTGCCCTTCCA (R)	$y = -3,327x + 26,951$ (0,99)	1,00
<i>wssB</i>	198	GGTGTTCACGCTGTGACGCAGGA (F) TGGCGCAGTGAAAGATCATCGAAA (R)	$y = -3,865x + 18,385$ (0,98)	0,99

5. Análisis y purificación de proteínas

5.1. Preparación de muestras proteicas para análisis del secretoma

Se creció Pto DC3000 en 400 ml de LB líquido por triplicado para cada condición (pJB3Tc19 y pJBpleD*) a 28°C y 300 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{660} de 1,2, se centrifugaron 15 min a 3.120 g y el sobrenadante se centrifugó nuevamente durante 30 min a 8.296 g para eliminar los detritos celulares. Se añadió ácido tricloroacético (10% concentración final) a este sobrenadante y se dejó precipitando toda la noche a 4°C para posteriormente centrifugarlo a 8.296 g durante 1 h. El pellet se lavó

6 veces con acetona al 80%, con el fin de eliminar los exopolisacáridos que coprecipitan con las proteínas. El pellet se secó durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 50 µl de tampón de lisis CHAPS (urea 8M y CHAPS 4%). El pH de las muestras se ajustó a pH 8,5 con NaOH 50 mM y su cuantificación se llevó a cabo con el Bio-Rad DC protein assay.

5.2. Sobreexpresión y purificación de proteínas

La sobreexpresión de la proteína FleQ se realizó en la cepa *E. coli* B834 (DE3) transformada con el plásmido pTYB12::*fleQ* (ver apartado 1.2.2.). Estas se cultivaron a 30°C en medio rico 2xYT suplementado con 100 µg/ml de ampicilina hasta una $DO_{660}=0,5-0,6$. Entonces se indujo la expresión de la proteína añadiendo al medio IPTG (0.3 mM concentración final). Tras 7 h de inducción a 15°C, se recogieron las células por centrifugación a 10.000 g y a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 30 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; glicerol 5% (v/v); EDTA 1 mM) suplementado con una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche). Tras mantener el sedimento celular en hielo durante 30 min, las células se rompieron en la prensa francesa a una presión de 10.000 psi. El lisado se centrifugó a 13.000 g durante 1 h a 4°C y se recuperó la fracción soluble, constituida por el sobrenadante. Con el fin de comprobar la sobreexpresión de FleQ en la fracción soluble, se tomaron alícuotas del cultivo antes y después de la inducción y analizó el perfil de proteínas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, apartado 5.4.2).

Para la purificación de las proteínas recombinantes se realizó una cromatografía de afinidad conocida como IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*). Este sistema se basa en la presencia de una inteína de 454 aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* fusionada en el extremo N-terminal de la proteína a purificar. Esta inteína presenta una alta afinidad por quitina, lo que permite la unión de la proteína recombinante a una columna de quitina. La adición de un agente reductor (DTT) induce la escisión de la inteína, permitiendo la elución y purificación de la proteína en su forma nativa, quedando la inteína unida a la columna de quitina. Las distintas fracciones solubles se pasaron a través de una columna de quitina (un total de 12 ml de sobrenadante del lisado bacteriano), quedándose unida a ella la proteína FleQ con la inteína fusionada en sus extremos N-terminales. A continuación, la columna se lavó con tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM) y la proteína (sin inteína) se eluyeron de la columna tras incubar con el tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM; DTT 50 mM) a 4°C durante 15 h. La proteína se concentró mediante el uso de filtros de centrifugación (Millipore, Billerica, MA) y se almacenaron a -80°C.

5.3. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el ensayo de Bradford (1976), utilizando el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad). En cada ensayo se realizó en paralelo una curva patrón con una solución fresca de albumina de suero bovino, siguiendo el protocolo *microassay* descrito en las instrucciones del fabricante.

5.4. Electroforesis de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas, tanto en geles nativos como desnaturizantes, se utilizó el equipo de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN II* (Bio-Rad). Para la electroforesis de geles en dos dimensiones se utilizó el equipo de electroforesis *IPGphor II* (Amersham Biosciences). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

5.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida 4,5% (p/v) de 1,0 mm de espesor preparados en tampón Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glicina 200 mM). A 10 μ l de muestra de proteínas (o complejo proteína-ADN) se añadieron 2 μ l de tampón de carga no desnaturizante (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; glicerol 40% (p/v); NaCl 100 mM; azul de bromofenol 0,2% (p/v); EDTA 0,1 mM) y se cargaron en los geles. Las electroforesis se llevaron a cabo en el mismo tampón Tris-glicina a 50 V durante 2,5 h y a 4°C.

5.4.2. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 o 1,0 mm de espesor de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constó de un segmento superior concentrador [Tris-HCl 125 mM pH 6,8; poliacrilamida 4,5% (p/v); SDS 0,1% (p/v)] y un segmento inferior separador [Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; poliacrilamida 10% o 12% (p/v); SDS 0,1% (p/v)]. A 10 μ l de muestra se añadió un volumen equivalente de tampón de carga para SDS-PAGE [Tris-HCl 100 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 20% (v/v); SDS 4% (p/v)]. Para las muestras de proteínas obtenidas en los apartados 7.1 y 7.2, a 12,5 μ l de muestra se añadieron 2,5 μ l de tampón de carga SDS [6x: Tris-HCl 350 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 30% (v/v); SDS 6% (p/v)]. En ambos casos las muestras se calentaron a 90°C durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Laemmli [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v)], a 100 V durante 1,5 h.

5.4.3. Geles bidimensionales

Para realizar los geles de dos dimensiones se marcaron 50 μ g de proteína de las muestras del secretoma para cada condición (pJB3Tc19 y pJBpleD*) con distintos colorantes fluorescentes de cianina Cy3 y Cy5 (Amersham Biosciences) a una concentración final de 2 mM. Las muestras proteicas provenientes de cada condición se incubaron durante 30 min en oscuridad a 4°C. Se detuvo el marcaje añadiendo lisina a una concentración final de 10 mM durante 10 min. Los extractos proteicos (pJBpleD*-Cy3 y pJB3Tc19-Cy5) se mezclaron, se añadió el mismo volumen de tampón 2 \times sample (urea 8 M; CHAPS 4%; DTT 2%) y se completó hasta un volumen final de 250 μ l con solución hidratadora (urea 8 M; CHAPS 4%; DTT 0,2%). Para correr la primera dimensión y separar las proteínas por su punto isoeléctrico se usaron tiras de IPG (*Immobilized pH gradient gel*) de un rango de pH de 3-10 utilizando el aparato IPGphor II (Amersham Biosciences). Inicialmente se aplicaron 20 V durante 10 h (200 V·h), después se aplicaron 500 V durante 1 h (500 V·h); posteriormente se aplicaron 1000 V durante 1 h (1.000 V·h), para finalmente

terminar de separar las proteínas por su punto isoeléctrico aplicando 8000 V durante 5 h (48.000 V·h). Después de haber corrido la primera dimensión, las tiras de pH se incubaron en una solución equilibradora (100 mM Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 8 M urea; 1% SDS) durante 15 min en agitación suave y se enjuagaron con SDS 1%.

Las tiras de pH se colocaron sobre el gel y se cubrieron con agarosa (agarosa 1% y 5 µg/ml azul de bromofenol). La segunda dimensión se corrió en geles desnaturalizantes al 12% aplicando una intensidad inicial de 20 mA durante 15 min y 80 mA durante 2 h. Los geles se conservaron a 4°C en solución fijadora (ácido acético 25%; acetona 50%).

5.5. Detección de proteínas

5.5.1. Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción con una solución de azul de Coomassie [0,25% (p/v) de azul de Coomassie en una mezcla de metanol:ácido acético:agua en proporción 45:10:45 (v/v/v)]. En lugar de las dos a cuatro h necesarias por el método tradicional, la tinción se aceleró calentando en microondas el gel sumergido en la solución anterior justo hasta que comenzó a hervir. Entonces se transfirió a la solución desteñidora (igual a la anterior pero sin azul de Coomassie), que se cambió frecuentemente por solución fresca hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez.

5.5.2. Tinción de proteínas con plata

Las proteínas se lograron visualizar tras teñir el gel con plata usando el kit comercial *Bio-Rad Silver Stain* (Bio-Rad laboratories) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción es 10-50 veces más sensible que la tinción con azul de Coomassie y se basa en el método descrito por Merrill *et al.* (1979).

5.5.3. Detección, cuantificación e identificación de proteínas en geles bidimensionales

Los geles de dos dimensiones se escanearon en un escáner Typhoon 9410 (Amersham Biosciences). Las imágenes obtenidas se compararon usando el software ImageQuant y exportadas al programa DeCyder (Amersham Biosciences) descrito por Karp *et al.* (2004). Este programa permite la detección y cuantificación de todas las proteínas que presentan alteraciones en su abundancia mediante la utilización de dos módulos, el módulo DIA y el módulo BVA. El módulo DIA (*differences in gel analysis*) permitió valorar las diferencias existentes entre geles de una misma condición (pJB3Tc19 o pJBpleD*) comparando las tres imágenes provenientes de las tres replicas biológicas. El módulo BVA (*biological variance analysis*) detecta diferencias entre las dos condiciones (pJB3Tc19 y pJBpleD*) en una imagen acumulativa resultado del solapamiento de las dos imágenes obtenidas (una por cada gel), cada una proveniente de los dos fluoróforos utilizados (Cy3 y Cy5). Para ello, en cada gel se enfrentan el secretoma de una determinada condición (Pto pJB3Tc19 o Pto pJBpleD*) marcados con un fluoróforo frente a un estándar interno (mezcla del secretoma en ambas condiciones, pJB3Tc19 y pJBpleD*) marcado con el fluoróforo contrario. Igualmente, se emplearon marcajes alternos Cy3 y Cy5 entre el secretoma problema y el

estándar interno para minimizar la posible influencia del fluoróforo en los datos obtenidos. Esta co-detección asegura que todas las proteínas se encuentran representadas en todas las imágenes analizadas. El algoritmo del módulo BVA cuantificó la abundancia de las proteínas en todas las imágenes y los valores de abundancia se representaron como ratios, que indican cambios en los niveles de proteína mediante una comparación directa de la proteína en la muestra analizada con su equivalente en el estándar interno. Esto permitió normalizar los datos y representar los valores de abundancia como el logaritmo del ratio. Gracias al apareamiento de las tres imágenes acumulativas provenientes de diferentes geles se realizó el análisis estadístico de los ratios con el fin de determinar si las diferencias observadas eran estadísticamente significativas ($p \geq 0.05$).

5.6. Ensayos de retardo en gel (EMSA)

El ensayo se basa en la diferencia de movilidad electroforética existente entre un fragmento de ADN libre y el complejo ADN-proteína ya que, en este último caso, la migración del ADN se ve retardada con respecto al ADN libre al unírsele una macromolécula globular de menor movilidad electroforética.

5.6.1. Obtención de la sonda

En este procedimiento se utilizaron dos fragmentos de ADN que contienen parte de la región intergénica PSPTO_1025-*wssA* generados por PCR con los cebadores *wssA-F* y *wssA-R* que amplifican un fragmento de 309 pb (*wssA1*), *wssAF2* y *wssAR2* que amplifican un fragmento de 323 pb (*wssA2*), y *wssAF* y *wssAR2* que amplifican un fragmento de 458 pb (*wssA1-2*). Como control positivo se amplificó un fragmento de ADN de 314 pb (*fleS1*) generado por PCR utilizando el par de cebadores *fleS-F* y *fleS-R*, que contiene parte de la región promotora del gen *fleS*. En la Tabla 9 se muestran los oligos utilizados para amplificar las sondas de los EMSA. Los fragmentos amplificados se purificaron de geles de agarosa (3.4.1) para, posteriormente, marcarlos radiactivamente.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para generar las sondas de los EMSA.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características	Fragmento
<i>fleSF</i> <i>fleSR</i>	ACCACCCTGGTCGAGAAG CTGTGCGGACATCTGATTG	Amplifica un fragmento de 314 pb por encima de <i>fleS</i> comprendido entre los nucleótidos 2.141.382 y 2.141.695 del genoma de Pto	<i>fleS1</i>
<i>wssAF</i> <i>wssAR</i>	CCAGCCACTGATTTAATTCG CGTCAGCACGACTCATTC	Amplifica un fragmento de 309 pb por encima de <i>wssA</i> comprendido entre los nucleótidos 1.119.694 y 1.119.985 del genoma de Pto	<i>wssA1</i>
<i>wssAF2</i> <i>wssAR2</i>	CGCCAATAAAATGTGCGAA TGTTGCTCGATAGACGG	Amplifica un fragmento de 323 pb por encima de <i>wssA</i> comprendido entre los nucleótidos 1.119.829 y 1.120.134 del genoma de Pto	<i>wssA2</i>
<i>wssAF</i> <i>wssAR2</i>	CCAGCCACTGATTTAATTCG TGTTGCTCGATAGACGG	Amplifica un fragmento de 458 pb por encima de <i>wssA</i> comprendido entre los nucleótidos 1.119.694 y 1.120.134 del genoma de Pto	<i>wssA1-2</i>

5.6.2. Marcaje de la sonda

El marcaje de las sondas se realizó por fosforilación en sus extremos 5'. La reacción, catalizada por la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK, Roche), permite la incorporación de un fosfato marcado radiactivamente situado en posición γ de una molécula de ATP, al extremo 5'-OH del ADN. Se marcaron entre 10-20 pmoles de los productos de PCR utilizados como sonda (ver apartado 3.3) en un volumen final de 10 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 5 mM; EDTA 0,1 mM; espermidina 0,1 mM), 1 μ l de [γ ³²P]-ATP (6.000 mCi/mmol) y 1 U de PNK. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 h. Posteriormente, la enzima se inactivó durante 10 min a 70°C y se añadieron 10 μ l de H₂O DEPC antes de pasar el volumen resultante por una columna *Micro Bio-Spin 6* (Bio-Rad) para eliminar el exceso de ATP radiactivo. El marcaje del fragmento se cuantificó utilizando un contador de centelleo TRI-CARB 1500 *Liquid Scintillation Analyzer* (Packard).

5.6.3. Reacción de unión y electroforesis

El ADN marcado (10.000 cpm, a 1 nM) se incubó durante 10 min con la proteína FleQ purificada (1 μ M) en 20 μ l finales de tampón de unión (Tris-acetato 25 mM pH 8,0; acetato magnésico 8 mM; KCl 10 mM; polietilenglicol 8000 3,5% (p/v) y DTT 5 mM) suplementado con polidI-dC (15 μ g/ml) y albúmina de suero bovina (200 μ g/ml). Las reacciones se incubaron en hielo en la nevera durante 30 min y posteriormente se les añadió 2 μ l de tampón de carga no desnaturante y se analizaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 4,5% (p/v) en condiciones no desnaturantes (apartado 5.4.1) en tampón Tris-glicina durante 3 h a 50 V en hielo. Tras la electroforesis, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM por adhesión, se cubrió con una película de plástico transparente y se secó al vacío a 80°C durante 20 min utilizando el sistema Gel Dryer 583 (Bio-Rad). Las bandas de ADN se visualizaron por exposición en pantallas BAS-IP MS2040 (Fuji) utilizando un equipo *Phosphor Imager Personal FX* (Bio-Rad). La cuantificación de la intensidad de las bandas analizadas se realizó con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad) suministrado con el equipo.

5.7. Ensayos de inmunoprecipitación ChIP-seq

Para llevar a cabo este ensayo, 20 ml de la cepa Pto portadora de la construcción pVL33::*amrZ*-HA se indujo durante 3h con IPTG 1 mM en LB, Km (25 μ g/ml) a 28°C. Las células se fijaron con formaldehído al 1% durante 10 min a temperatura ambiente. El proceso se interrumpió mediante la adición de glicina a una concentración final de 120 mM. En frío, se lavaron las células con PBS, para posteriormente lisarlas en un tampón de sonicación no iónico (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, EDTA 5 mM, 1% Triton X-100, 0,5% NP-40) que contiene el cóctel inhibidor de proteasas (Roche) y se sonicó durante 10 min en un Bioruptor TM UCD-200 TM. Los detritos se eliminaron por centrifugación y el lisado se dividió en dos para precipitarlo con 6 mg de anticuerpo anti-HA (12CA5, Roche) y con el control negativo IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology) y 30 ml de Dynabeads® proteína G (Invitrogen). Posteriormente, los inmunocomplejos se lavaron tres veces con tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 2 mM, 1% Triton X-100, 0,1% SDS) que contiene una concentración creciente de NaCl (150-500 mM) y se eluyó de las perlas con

tampón de elución (25 mM de Tris-HCl, pH 8, EDTA 10 mM, 1% de SDS). El ADN inmunoprecipitado fue liberado revirtiendo la temperatura a 65°C durante 6 h y posteriormente se purificó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN inmunoprecipitado se analizó mediante qPCR y secuenciación con los oligos indicados en la Tabla 10. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador Illumina Genome Analyzer IIx en el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en las qPCR de los ensayos de inmunoprecipitación.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
amrZ chip_F amrZ chip_R	TGCATTATGTTGGCTCCTTGG CGGTTAGTTCAGGGGAAGCG	Amplifica un fragmento de 487 pb por encima de <i>amrZ</i>
gyrA chip_F gyrA chip_R	GCTGAAGCAGTCTACCTCGAC GGCTTGTTCCAGTCGTTACCC	Amplifica un fragmento de 565 pb de <i>gyrA</i>
wssA chip_F wssA chip_R	GCGTAAAACCTCGAATCAGC TATGGCGTCCACAATTACCG	Amplifica un fragmento de 403 pb por encima de <i>wssA</i>

6. Mutagénesis con Tn5

6.1. Conjugación y selección de transconjugantes

Para llevar a cabo la mutagénesis generalizada se utilizó como cepa donadora *E. coli* β 2163 (pSUP2021) y como cepas receptoras la silvestre, Pto DC3000, y un mutante que no produce flagelina (*fliC*) y que, por tanto, carece de flagelos: Pto *fliC*. Se utilizó este mutante para evitar que los transconjugantes se dispersaran en la placa mediante movimiento *swarming*, como ocurre con la cepa silvestre, lo que complica la selección de los mismos. La cepa de *E. coli* β 2163 es auxótrofa para el ácido diaminopimélico (DAPA), por lo que es necesario añadir al medio de cultivo 0,3 mM de DAPA para su crecimiento, tanto en líquido como en placa. Esta característica resulta muy útil para la selección tras la conjugación porque, al emplear placas de LB sin DAPA, en las que no crece la cepa donadora, se seleccionan solo los transconjugantes. El plásmido pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983) porta el transposón Tn5 utilizado en este estudio para realizar la mutagénesis generalizada (Figura 15).

Cultivos en LB de las células donadoras y de las receptoras crecidos durante toda la noche se mezclaron en proporción 1:1, se lavaron con medio sin antibiótico, el pellet celular se resuspendió en 50 μ l de LB y se colocó sobre una membrana en una placa de LB con DAPA (0,3 mM). Se realizó este mismo procedimiento con los controles Pto *fliC* y *E. coli* β 2163 (pSUP2021), que se colocaron por separado. Tras incubar las placas unas 12 h a 25°C, los discos de la conjugación, así como los de las células donadoras y células receptoras crecidas por separado, se resuspendieron en LB y se sembraron varias diluciones en placas de LB con los correspondientes antibióticos con el fin de seleccionar y contar los transconjugantes.

Además, se tomaron 1,5 ml de la suspensión bacteriana sin diluir y se añadieron a 150 ml de LB, incubándose a 25°C durante 12 h en agitación para el enriquecimiento de los transposantes. Al día siguiente se introdujo el plásmido pJBpD* en masa a dichos transposantes. Para ello, se mezclaron 750

µl de cultivo de los transposantes con 750 µl de un inóculo del donador *E. coli* β2163 (pJBpleD*) y se siguió el mismo procedimiento que para la conjugación anterior. Finalmente, se sembraron diferentes diluciones en placas de LB con CR (50 µg/ml) y los antibióticos correspondientes para la selección de los transconjugantes y observación de su fenotipo: colonias blancas (CR-), rojas (CR+) o muy rojas (CR++).

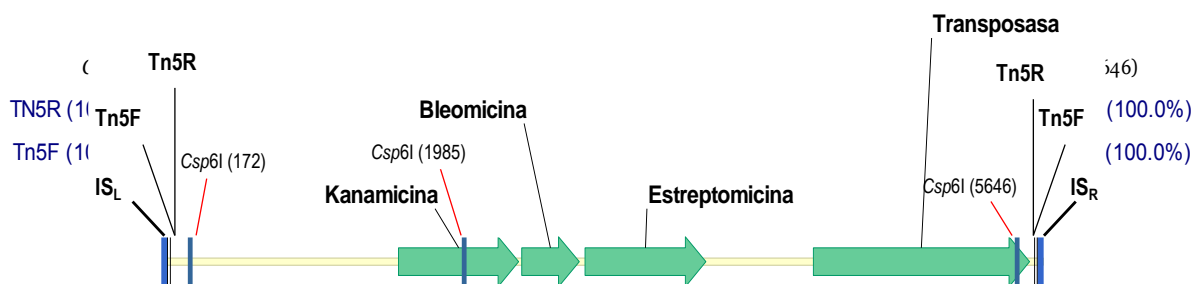


Figura 15. Esquema del transposón Tn5. Se muestran los sitios de restricción de la enzima Csp6I, los sitios de reconocimiento de los oligos Tn5F y Tn5R y las secuencias invertidas repetidas (ISs). El transposón tiene un tamaño de 5.818 pb y porta los genes de resistencia a kanamicina, bleomicina y estreptomicina y el gen que codifica la transposasa.

6.2. Funcionalidad de PleD*

Con el fin de comprobar si el fenotipo CR⁻ observado en los transconjugantes era absolutamente dependiente de *pleD**, se determinó la presencia y funcionalidad del gen. En primer lugar, se llevaron a cabo PCRs de colonias con los oligonucleótidos pJB3TC19_F y pJB3TC19_R (Tabla 4) para detectar la presencia del gen *pleD** empleando como controles positivos colonias CR⁺ y CR⁺⁺. A continuación y para descartar que las colonias CR⁻ blancas obtenidas presentaran ese fenotipo como consecuencia de la pérdida de funcionalidad de *pleD**, se extrajeron los plásmidos pJBpleD* de las colonias CR⁻ y se electroporaron en células electrocompetentes de Pto. Las células electroporadas se seleccionaron en LB Tc₁₀ y CR₅₀ para comprobar si el *pleD** presente en los distintos plásmidos era funcional, es decir, si inducía la producción de exopolisacáridos que tornaba rojas las colonias.

6.3. Mapeo de los mutantes

Se escogieron, tanto colonias CR⁻ como colonias CR⁺⁺, y se les extrajo su ADN genómico, que se digirió (1 µg) con la enzima Csp6I (1 U) a 37°C durante 2 h. Esta enzima de restricción tiene una alta frecuencia de corte en el genoma de Pto y un sitio de corte en ambos extremos del transposón Tn5 (Figura 2). La enzima se inactivó a 65°C durante 20 min y parte del ADN digerido (200 ng) fue posteriormente religado en condiciones de religación intermolecular con T4 DNA ligasa (1U, Roche) a 16°C durante 16 h.

Para determinar el sitio de inserción del Tn5, se realizó una PCR inversa con dos oligos, Tn5F y Tn5R, que hibridaban en los extremos del transposón y en sentido inverso (Figura 15, Tabla 11), en las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, 30 ciclos (45 s a 94°C, 45 s a 55°C y 2 min a 72°C), con una extensión final de 10 min a 72°C). Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit *Gel-Purifying PCR Products* (Invitrogen) y se secuenciaron.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de los mutantes con Tn5

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Tn5F	GCGTCCTGAACGGAACCTTT
Tn5R	TCCCGTTTTCCAGGATCTG

7. Ensayos *in vivo*

7.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos

7.1.1. Determinación de la producción de exopolisacáridos con CR y CF

El CR y el CF permiten detectar la producción de componentes extracelulares tales como polisacáridos neutros o básicos y algunas proteínas, siendo el CF específico para enlaces glucosídicos β 1-4 o β 1-3 (Teather y Wood, 1982; Spiers *et al.*, 2002). El CR se preparó a una concentración de 5 mg/ml en agua y se esterilizó por filtración, añadiéndose al medio sólido a una concentración final de 50 μ g/ml. Aquellas colonias capaces de unir este colorante se tornan de color rojo intenso. El calcoflúor se añadió al medio sólido en ebullición para su disolución a una concentración de 200 μ g/ml y posteriormente las placas fueron observadas bajo luz ultravioleta en un transiluminador. Las colonias positivas fluorescen en esas condiciones.

7.1.2. Cuantificación de la producción de celulosa en cultivos líquidos

Para determinar de forma cuantitativa la producción de celulosa en cultivos líquidos se aprovechó su capacidad para unirse al calcoflúor. Se partió de un preinóculo en LB en fase estacionaria que, tras lavarse en medio mínimo MMR se inoculó en matraces (dilución 1:100) con 10 ml de MMR y CF 100 μ M que se incubaron a 20°C durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se recogieron los cultivos, se centrifugaron durante 10 min a 3.220 g, se eliminó el sobrenadante conteniendo los restos de CF no unidos y se resuspendieron las bacterias en agua destilada hasta completar un volumen de 10 ml. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas a partir de esta suspensión inicial siendo la dilución 10^{-2} la utilizada para realizar las medidas en cubetas de cuarzo de 2 ml en un fluorímetro PTI (Photon Technology International). Se utilizó una longitud de onda (λ) de excitación de 365 nm y se hizo un barrido de longitudes de onda de emisión: desde los 365 a los 505 nm cada 5 nm. Para realizar los cálculos escogimos $\lambda=435$ nm, por ser el pico de emisión máxima del calcoflúor. Se llevaron a cabo medidas de 3 réplicas biológicas de cada cepa, expresando los resultados en unidades arbitrarias/ $DO_{660} \pm$ desviación estándar.

7.2. Ensayos de motilidad bacteriana

7.2.1. Ensayos de *swimming*

A partir de placas de Pto DC3000 y mutantes crecidas en LB durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en $MgCl_2$ 10 mM y se ajustó a una DO_{660} de 2,0. Alícuotas de 2 μ l de esta suspensión se inocularon pinchando en el centro de placas de Petri preparadas con 25 ml de LB (0,3% agar) y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar durante 5 min. Las placas se incubaron boca arriba a 25°C durante 48 h. Se realizaron tres placas por condición y, al menos, 3 experimentos independientes.

El diámetro de halo de dispersión se midió cada 24 h hasta las 48 h y la motilidad se expresó como la media del diámetro del halo a las 48 h de incubación \pm la desviación estándar, a partir de los datos de al menos 9 placas de motilidad para cada condición.

7.2.2. Ensayos de swarming

A partir de placas frescas de Pto DC3000 y mutantes crecidas en LB durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en MgCl₂ 10 mM y se ajustó a una DO₆₆₀ de 2,0. Alícuotas de 2 μ l de esta suspensión se colocaron en la superficie de placas de Petri preparadas con 25 ml de PG-agar (0,5%) y se secaron en la cabina de flujo laminar durante 5 min. Las placas se incubaron a 25°C y la motilidad en superficie se observó a las 24 h. Se utilizaron tres placas por condición y se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

7.3. Formación de biopelículas

A partir de placas frescas de Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*) crecidas en LB Tc₁₀ durante 48 h a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en MgCl₂ 10 mM y se ajustó a una DO₆₆₀ de 2,0. En tubos de borosilicato con 4 ml de MMR y Tc₁₀ se ajustó el inóculo inicial a una DO₆₆₀ de 0,01 y se incubó durante 72 h en estático a 20°C.

7.4. Ensayos de infección en planta

Los ensayos de infección de Pto DC3000, y los mutantes derivados de la misma, se realizaron en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) de cuatro o cinco semanas de edad y cultivadas en una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas: fotoperiodo de día largo (16/8 h luz/oscuridad; 24/18°C día/noche) y una humedad relativa del 60%. Previamente a los ensayos, las plantas se trataron para favorecer la apertura estomática y, por tanto, la infección bacteriana. Para ello, se regaron aproximadamente 1 h antes y se pulverizaron las hojas con agua 30 min antes de proceder a la inoculación. Se llevaron a cabo ensayos de inoculación por infiltración y por spray.

7.4.1. Preparación del inóculo

Las cepas bacterianas cultivadas durante 48 h a 28°C en placas de LB se resuspendieron en MgCl₂ 10 mM y se lavaron dos veces, tras lo cual se ajustó la densidad celular a DO₆₆₀=0,1 (correspondiente a 10⁸ ufc/ml). Según el ensayo, se utilizó esta suspensión o se realizaron diluciones seriadas para obtener los inóculos a los títulos deseados. Siempre se confirmó el título de las suspensiones utilizadas realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de LB suplementado con Rif₁₀ para la cepa silvestre y en LB suplementado con Km₂₅ para las mutantes.

7.4.2. Infección

La infiltración de la suspensión bacteriana con aproximadamente 10^6 ufc/ml se realizó en el envés de la hoja con una jeringa de 2 ml sin aguja. Las plantas utilizadas como controles negativos se infiltraron con una solución de 10 mM $MgCl_2$.

Para la inoculación por aspersión se utilizaron también suspensiones bacterianas con aproximadamente 10^6 ufc/ml, inoculándose 5 folíolos de una hoja de tomate por planta, 3 veces por el haz y 3 veces por el envés. Como tratamiento control, las plantas se inocularon del mismo modo con $MgCl_2$ 10 mM. El análisis de la evolución de los síntomas y las densidades bacterianas *in planta* se realizaron 3 h después de la inoculación (tiempo 0) y a diferentes días después de la inoculación (dpi, días post-inoculación).

Para determinar las densidades bacterianas *in planta* se extrajeron al menos 3 muestras por hoja, cada una de 5 discos extraídos con un sacabocados (diámetro 10 mm) y se maceraron por percusión mecánica (IKA RW16 basic) en 1 ml de $MgCl_2$ 10 mM. A partir del macerado, se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en medio LB suplementado con el correspondiente antibiótico para determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de área (UFC/cm²).

8. Medición de los niveles de c-di-GMP

8.1. Extracción de c-di-GMP

Para la extracción del c-di-GMP se siguió el protocolo descrito por Amikam *et al.* (1995). A partir de un cultivo de 10 ml de LB a DO_{660} de 1 se detuvo el metabolismo de las diferentes cepas de Pto mediante la adición de formaldehído a una concentración final de 0.19%. Una vez detenido el metabolismo bacteriano, el cultivo se centrifugó 20 min a 3.220 g a 4°C, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular en 3 ml de H₂O milliQ fría, que luego se repartieron en tres alícuotas de 1 ml. El pellet celular se centrifugó durante 3 min a 15.700 g a 4°C y el sobrenadante se descartó. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 0.5 ml de H₂O milliQ fría y se hirvió durante 5 min, para luego añadir etanol al 100% frío hasta una concentración final del 65%, homogenizando con la ayuda del vórtex. Las muestras se centrifugaron nuevamente durante 3 min a 15.700 g a 4°C y se recuperó el sobrenadante para posteriormente secarlo en vacío a una temperatura de 50°C durante aproximadamente 7 h. Las muestras secas se resuspendieron en acetato amónico 10 mM pH 5,5, ajustando el volumen de acuerdo a las densidades ópticas iniciales del cultivo (300 μ l para el de menor DO_{660}). Las muestras se filtraron con filtros GHP Acrodish de un tamaño de poro de 0,45 μ m y a 200 μ l de muestra se añadió c-di-GMP puro sintético (Axxora) a una concentración final de 250 nM hasta completar 300 μ l de volumen final.

8.2. Análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas

Todas las muestras de c-di-GMP se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) en el servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Jaén. El equipo empleado está compuesto de un cromatógrafo Agilent 1100, acoplado a un

espectrómetro de masas con una trampa iónica como analizador (Esquire 6000 de Bruker Daltonics). Para confirmar la identidad del analito, se determinaron tres picos (relación carga/masa (m/z) de 540, 248 y 152; Figura 16) provenientes de la fragmentación de la molécula de c-di-GMP por ionización positiva. El área del pico de 540 se utilizó para estimar la cantidad de c-di-GMP. Las cantidades del segundo mensajero en las diferentes cepas de Pto se expresaron por mg de proteína total. Se realizó una curva estándar con c-di-GMP sintético en un rango de concentraciones de 2 nM, 20 nM, 200 nM, 2000 nM y 20000 nM.

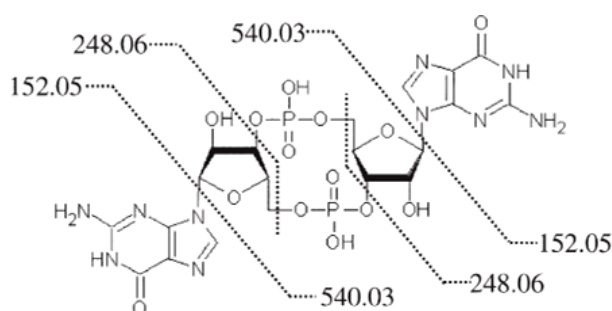


Figura 16. Modelo de fragmentación del c-di-GMP. Las líneas de puntos indican los iones correspondientes a doble fragmentación ($m/z = 248$) o a fragmentación sencilla ($m/z = 152$ y 540).

9. Ensayos de microscopía

Para estudiar la abundancia de flagelos en el microscopio óptico, se utilizó la tinción de Leifson modificada por Clark (1976). Una solución de 1,2% de fucsina básica preparada en 95% de etanol y estabilizada durante toda la noche a 25°C, se mezcló con un volumen igual de una solución de NaCl 0,75% y 1,5% de ácido tánico preparada en agua MilliQ. El pH final del colorante se ajustó a 5,0 con NaOH 1 N. Las células de placas de *swarming* incubadas a 25°C durante 20 h se recogieron con MgCl₂ 10 mM y se ajustaron a una DO₆₆₀ de 1,0. Posteriormente se fijaron con 1 ml de solución de paraformaldehído al 4% en cacodilato sódico 0.1 M pH 7,2 por cada ml de cultivo durante 30 min. La suspensión se centrifugó, se lavó y resuspendió en 1 ml de agua MilliQ. Los portaobjetos se sumergieron durante 24 h a temperatura ambiente en una solución de dicromato ácido, se enjuagaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Una gota de suspensión de cultivo se colocó en el centro del portaobjetos, se dejó correr a lo largo de este y se secó a temperatura ambiente. A continuación, 1 ml del colorante se añadió durante 15 min, tras lo cual el portaobjetos se lavó con agua corriente, se secó al aire, se montó con Merckoglass (Merck) y se examinó bajo el microscopio óptico (Zeiss Axioskope).

CAPÍTULO I

Análisis *in silico* de proteínas que interaccionan con el c-di-GMP en bacterias mutualistas y patogénicas de plantas

1. Identificación y clasificación de proteínas que interactúan con el c-di-GMP en bacterias mutualistas y patogénicas de plantas

La disponibilidad de la secuencia de genomas bacterianos permite el análisis genómico y funcional orientado al estudio de proteínas específicas mediante la identificación de sus genes y su posterior caracterización. En este capítulo, planteamos un estudio comparativo de proteínas que interactúan con el c-di-GMP en bacterias que interactúan con plantas, tanto fitopatógenas (distintos patovares de *Pseudomonas syringae*) como simbióticas (diferentes miembros del orden Rhizobiales). Debido al gran número de proteínas codificadas en los genomas de estas bacterias y con objeto de hacer el estudio abordable, nos hemos centrado en la identificación de dichas proteínas en las cepas modelo *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Sme) (Capela *et al.*, 2001; Buell *et al.*, 2003). Sin embargo y en la medida de lo posible, dicho estudio comparativo se ha extendido a otros géneros y especies dentro de los órdenes Pseudomonadales y Rhizobiales.

El análisis de los distintos genomas bacterianos se llevó a cabo con las herramientas Pfam (Finn *et al.*, 2008), BLAST (Altschul *et al.*, 1997) y SMART (Ponting *et al.*, 1999), lo que permitió identificar proteínas que presumiblemente interactúan con el c-di-GMP. Atendiendo al tipo de interacción, podemos clasificarlas en dos grandes grupos: proteínas que regulan los niveles intracelulares del c-di-GMP (DGC y PDE) y proteínas efectoras que, tras unirse al segundo mensajero, ejercen su función biológica. En estas últimas, el dominio efector mejor conservado y caracterizado hasta el momento es el dominio PilZ. Tal y como se observa en la Tabla 12, las cepas analizadas codifican un gran número de proteínas que interactúan con c-di-GMP en sus genomas. Por ejemplo, en el genoma de Pto existen 16 proteínas con dominios GGDEF, 2 proteínas con dominios EAL y 19 proteínas que portan ambos dominios. El número de proteínas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP incrementa con el tamaño del genoma, pero no de forma lineal sino que más bien parece estar relacionado con las capacidades adaptativas de cada organismo (Seshasayee *et al.*, 2010). Así, por ejemplo, las bacterias patógenas oportunistas, que generalmente se enfrentan a ambientes muy cambiantes, suelen poseer un gran número de proteínas con dominios GGDEF y EAL (Seshasayee *et al.*, 2010). Este es el caso de *V. cholerae*, que posee 62 posibles proteínas involucradas en la síntesis y degradación del c-di-GMP (Beyhan *et al.*, 2008). Por el contrario, bacterias patógenas intracelulares obligadas que habitan un ambiente estable suelen codificar un número bajo de proteínas relacionadas con el c-di-GMP, como el parásito intracelular obligado *Rickettsia prowazekii*, agente causal del tifus exantemático epidémico, que tan solo posee 1 proteína con un dominio GGDEF y 1 proteína con un dominio EAL.

Tabla 12. Genes que codifican proteínas con dominios HD-GYP, EAL, GGDEF y PilZ en diferentes genomas bacterianos. El número de dominios presentes en los respectivos genomas bacterianos se ha obtenido en Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), excepto los dominios HD-GYP, que provienen de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html y Galperin (2010).

Cepa	Nº genes	HD-GYP	EAL	GGDEF	GGDEF/EAL	PilZ
Pseudomonadales						
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	5740	3	6	17	16	7
<i>P. fluorescens</i> SBW25	6106	6	7	21	17	7
<i>P. putida</i>	5350	2	3	19	14	7
<i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000	5661	3	2	16	19	8
Rhizobiales						
<i>A. tumefaciens</i> (C58/ATCC33970)	1884	1	1	14	13	3
<i>B. abortus</i>	1156	0	0	0	0	1
<i>B. japonicum</i> USDA110	8317	3	4	12	23	9
<i>B. melitensis</i>	1166	0	2	3	3	1
<i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	4685	0	1	4	7	1
<i>M. loti</i> MAFF303099	7275	1	2	10	16	2
<i>R. etli</i> CFN42	5963	1	0	14	21	3
<i>R. leguminosarum</i> bv. viciae (strain 3841)	7150	3	0	16	22	3
<i>S. meliloti</i> 1021	6205	1	2	6	12	2

1.1. Hipotéticas diguanilato ciclasas portadoras de dominios GGDEF

Las proteínas con dominios DGC se caracterizan por presentar dos sitios, el sitio A y el sitio I (Figura 17). El sitio A hace referencia a la secuencia GG[D/E]EF del centro catalítico de la enzima que es indispensable para el ciclado de las moléculas de GTP. Por tanto, se puede especular que existen dos clases de dominios GGDEF atendiendo a su función: los catalíticamente activos (A⁺) y los degenerados, que presentan alguna sustitución en el motivo GG[D/E]EF canónico (A⁻). Este ha sido el criterio adoptado en este estudio por ser el aceptado actualmente, aunque recientemente se han descrito DGC activas que presentan modificaciones en el motivo canónico GG[D/E]EF (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011; Chen y Schaap, 2012; Österberg *et al.*, 2013; Römling *et al.*, 2013; Tamayo, 2013). El sitio I es un sitio alostérico con alta afinidad para el c-di-GMP que está ubicado a 5 aminoácidos del sitio A e inhibe no competitivamente la actividad del mismo. Presenta una secuencia conservada RXXD (I⁺) y modificaciones en alguno de los dos aminoácidos conservados supuestamente impiden la unión al c-di-GMP (I⁻, Jenal y Malone, 2006).

La clasificación de las DGC en función de la actividad de sus sitios A e I (Jenal y Malone, 2006) permite distinguir 4 tipos (Figura 17):

- I⁺A⁺: posiblemente implicada en cascadas reguladoras de los niveles de c-di-GMP en los que se requiere una regulación alostérica fina mediante un control estricto de la producción de c-di-GMP. Es frecuente en DGC que presentan una alta actividad (De *et al.*, 2009).
- I⁺A⁻: hipotéticamente pueden actuar como efectores moleculares en respuesta a la unión del c-di-GMP al sitio I (Jenal y Malone, 2006; Tamayo *et al.*, 2007; Schirmer y Jenal, 2009).
- I⁻A⁺: podrían ser proteínas con baja actividad DGC y/o que no requieren inhibición alostérica (Seshasayee *et al.*, 2010).

- I-A⁻: se encuentran frecuentemente, lo que sugiere que, a pesar de no ser catalíticamente activos, estos dominios deben ser relevantes desde el punto de vista biológico. Un motivo GGDEF degenerado puede unir GTP, por lo que se ha propuesto que este tipo de proteínas podría estar implicado en la detección de cambios en los niveles energéticos celulares (Jenal y Malone, 2006).



Figura 17. Clasificación de proteínas con dominios GGDEF atendiendo a la conservación de la secuencia del sitio catalítico (A) y del sitio alostérico (I). En la figura se muestra una representación de 4 proteínas como ejemplo de cada uno de los tipos (I⁺A⁻, I⁺A⁺, I⁻A⁺ y I⁻A⁻) de DGC descritos por Jenal y Malone (2006). Los sitios inhibitorios (I) y catalíticos (A) se encuentran subrayados. En verde se resalta la secuencia conservada con la secuencia canónica descrita para el sitio inhibitorio (RXXD) y en rojo para el sitio catalítico (GG[D/E]EF). Modificada de Jenal y Malone (2006).

La presencia de las 4 posibles combinaciones I⁺A⁻, I⁺A⁺, I⁻A⁺ y I⁻A⁻ en bacterias sugiere que la regulación de este tipo de enzimas es compleja. Además, estos sitios se pueden encontrar asociados a una gran variedad de dominios adicionales que actúan como sensores, efectores o implicados en la transducción de señales, tal y como se ha demostrado para los dominios EAL degenerados (Newell *et al.*, 2009; ver apartado 1.2). Este hecho sugiere que, en bacterias, la red regulatoria del c-di-GMP integra múltiples señales tanto ambientales o externas, como celulares o internas (Chang *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2001a; Hickman *et al.*, 2005; Galperin, 2006).

Los dominios GGDEF codificados en el genoma de Pto y Sme se clasificaron según los tipos descritos por Jenal y Malone (2006), lo que proporciona una valiosa información sobre la posible función de estas proteínas (Tablas 13 y 14). En la Figura 18, se observa que existe un alto número de proteínas de tipo A⁺; es decir, proteínas que probablemente tienen actividad DGC: el 74% y 61% de las proteínas con dominios GGDEF en Pto y Sme, respectivamente, poseen un hipotético sitio catalítico activo. Asimismo, en ambas cepas la combinación mayoritaria de sitio catalítico y alostérico es de tipo I⁺A⁺ (48% y 33% de las DGC de Pto y Sme, respectivamente). El 26% y 28% de proteínas con dominios GGDEF en Pto y Sme, respectivamente, presentan una combinación de tipo I⁻A⁺ y, por tanto, carecen del sitio alostérico (I) conservado. Esto, sin embargo, no implica que estas proteínas carezcan de regulación alostérica, ya que

muchas de ellas se encuentran asociadas a dominios efectores tales como motivos EAL degenerados que podrían ejercer esta función (Galperin *et al.*, 2001a). Sin embargo, hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios bioquímicos en proteínas híbridas GGDEF⁺/EAL⁻ que demuestren el papel regulador de los dominios EAL degenerados sobre la actividad DGC. No obstante, la delección del motivo EAL degenerado de la proteína DgcA1 de *G. xylinus* anula la actividad DGC de la misma, lo que sugiere una importante función estructural y/o reguladora de esos motivos en proteínas GGDEF/EAL (Römmling *et al.*, 2013).

Tabla 13. Clasificación funcional de los 35 dominios GGDEF identificados en proteínas de Pto DC3000. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 8 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Christen *et al.* (2006). En verde se indican los residuos no conservados.

Proteína	I RXXDXXXRXGG[D/E]EF	A	I Actividad	A Actividad
PSPTO_0114	DAGDQIARLGGDEF		-	+
PSPTO_0304	RRGDLFGRIGGEFF		+	+
PSPTO_0306	GNETTLLARPGDEF		-	+
PSPTO_0339	RPADFLARFGGEFF		+	+
PSPTO_0406	SPTDVLARFASNEF		-	-
PSPTO_0505	NGGGRAYRYGGEFF		-	+
PSPTO_0536	RDIDTVARLGGDEF		+	+
PSPTO_1004	DGGAVAFRFGGEEV		-	-
PSPTO_1278	NASDTLGRVDGDQF		-	-
PSPTO_1305	RPGDQLARYGGEFF		+	+
PSPTO_1346	RAFDVAAARWGGEFF		+	+
PSPTO_1348	RANDVLARIGGDEF		+	+
PSPTO_1499	RPSDLPARYGGEFF		+	+
PSPTO_1616	RSDDLIGRCGGDEF		+	+
PSPTO_1737	RSDDTLARLGGDEF		+	+
PSPTO_1739	RNIDRVFRYGGEFF		+	+
PSPTO_2171	RQEDTVARLGGDEF		+	+
PSPTO_2313	RSDDVFCRLGGEFF		+	+
PSPTO_2591	RPGDVAAARYGGEFI		+	-
PSPTO_2699	REEDLLARLGGDEF		+	+
PSPTO_2757	HLHDTLARVGGDEF		-	+
PSPTO_2807	RSSDMAARWGGEFF		+	+
PSPTO_2907	SNTVHVSRLGGDEF		-	+
PSPTO_3243	RRQDLLCRLAGDRF		+	-
PSPTO_3796	PGSLAFGRMGGEFF		-	+
PSPTO_3886	PSRDFVGHIGGDDF		-	-
PSPTO_4106	RVQDVVARFGGDEF		+	+
PSPTO_4208	RAGDTVARLSANEF		+	-
PSPTO_4365	GRLGALARLGGDQF		-	-
PSPTO_4543	PRTCPLYKVGPTRF		-	-
PSPTO_4631	SADDTVARMGGDEF		-	+
PSPTO_4784	SGSHCAGRIGGEFF		-	+
PSPTO_4837	RKTDFIGRYGGEFF		+	+
PSPTO_5014	RPYDVLARIGGDEF		+	+
PSPTOA0034	SDTVHVSRLGGDEF		-	+

Tabla 14. Clasificación funcional de los 18 dominios GGDEF identificados en proteínas de *S. meliloti* 1021. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 8 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Christen *et al.* (2006). En verde se indican los residuos no conservados.

Proteína	I RXXDXXXRXGG[D/E]EF	A	I Actividad	A Actividad
SMc00033	GEEKFLGHVGGDDF		-	-
SMc00038	RRSDSVVRVGGDEF		+	+
SMc00074	RPQDTLARLGGDQF		+	-
SMc00887	PEGATVTRTADDEF		-	-
SMc00992	QEPAILARLSGDEF		-	-
SMc01370	RRSDSVVRVGGDEF		+	+
SMc01464	AGRGVLGRIGGEEF		-	+
SMc03141	MLARLKTREQAADL		-	-
SMc03178	RQDDFVARIGGDEF		+	+
SMc03942	GSEATAARLMGDEF		-	-
SMc04015	RRSDCFGRIGGEEF		+	+
SMA0137	AAGAAISRIGGDEF		-	+
SMA1548	RTTETVARLGGDEF		-	+
SMA2301	RNRDHVARYGGEEF		+	+
SM_b20389	RAGDIAIRMGGDEF		+	+
SM_b20447	RDREFAYRLAGDEF		-	-
SM_b20523	PHRAVAGRVGGEEF		-	+
SM_b20900	GEADTIARLGGDEF		-	+

Asimismo, se identificaron proteínas A⁻, es decir, proteínas cuyo dominio GGDEF está degenerado y probablemente carecen de actividad DGC. Sorprendentemente, los dominios de tipo A⁻ se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas de las bacterias hasta ahora secuenciadas indicando que, a pesar de carecer de actividad catalítica, deben ser relevantes desde el punto de vista biológico (Seshasayee *et al.*, 2010). Pto y Sme no son una excepción, con un 26% y 39%, respectivamente. Conviene resaltar que un motivo GGDEF degenerado aún puede unir GTP, por lo que podría estar implicado en la detección de los niveles de este nucleótido (Christen *et al.*, 2005; Jenal y Malone, 2006; Kuchma *et al.*, 2007). Dentro de este grupo, la mayoría presentan el sitio alostérico inactivo (I-A⁻; Figura 18), lo que sugiere que, en la mayoría de los casos, la regulación alostérica se pierde cuando la proteína no posee actividad DGC. En Pto y Sme, al igual que se ha observado en otras bacterias, los motivos de tipo I-A⁻ se encuentran preferentemente asociados a otros dominios (ver apartado 2.1). Un ejemplo es PdeA (CC_3396) de *C. crescentus*, que presenta un motivo EAL activo en el extremo C-terminal y un motivo GGDEF (I-A⁻) degenerado en el extremo N-terminal (Christen *et al.*, 2005). La actividad PDE de la proteína se encuentra controlada alostéricamente por la unión de GTP al motivo GEDEF degenerado, lo que pone de manifiesto el papel regulador de estos motivos, que es independiente de su capacidad para sintetizar c-di-GMP (Christen *et al.*, 2005).

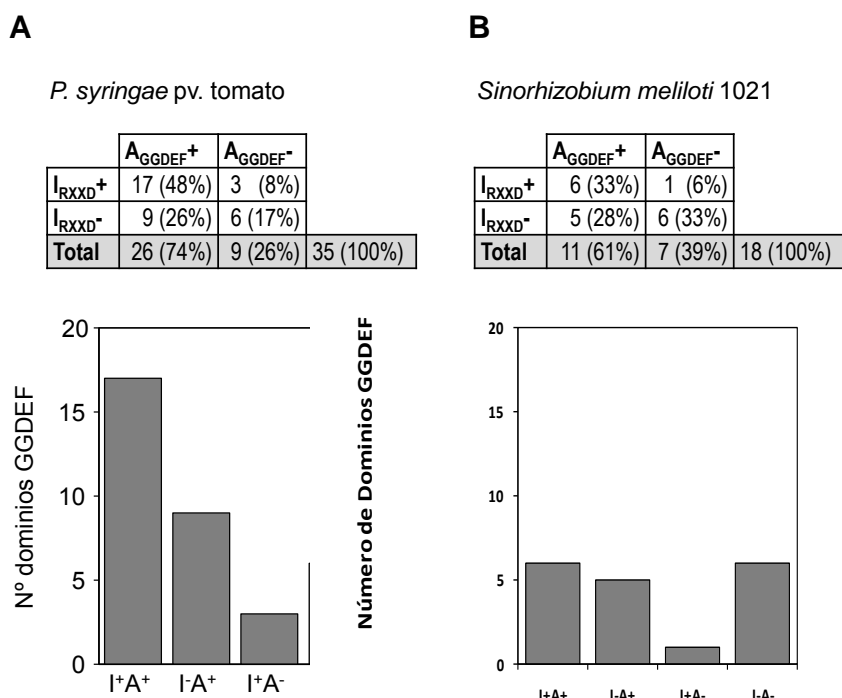


Figura 18. Clasificación funcional de los sitios catalíticos y alostéricos en proteínas con dominios GGDEF presentes en Pto y Sme. La clasificación se ha hecho atendiendo a las secuencias de los sitios establecidas por Jenal y Malone (2006).

Por último, solo un 8 y un 6% de las proteínas con dominios GGDEF en Pto y Sme, respectivamente, son de tipo I⁺A⁻ (Figura 18). Estas proteínas podrían actuar como efectores uniendo c-di-GMP a través de sus sitios alostéricos activos (I⁺). Un ejemplo de proteína I⁺A⁻ es PopA de *C. crescentus*, que controla la progresión del ciclo celular en esta bacteria tras unirse al c-di-GMP a través de su sitio I (Duerig *et al.*, 2009). CdgG de *V. cholerae* posee un dominio GGDEF degenerado e inactivo y requiere la unión de c-di-GMP al motivo RXXD para regular la rugosidad de las colonias a nivel post-transcripcional (Beyhan *et al.*, 2008).

1.2. Hipotéticas fosfodiesterasas portadoras de dominios EAL

Los dominios EAL catalizan la hidrólisis del c-di-GMP a una estructura linear de 5'-fosfoguanililguanosa (pGpG) que, a su vez, es sustrato de otra fosfodiesterasa que da lugar a dos nucleótidos de guanosín monofosfato (GMP). Existen otros dominios con actividad fosfodiesterasa, llamados HD-GYP, que unen c-di-GMP y lo hidrolizan produciendo directamente y en un solo paso dos moléculas de GMP (Ryan *et al.*, 2006b; Rao *et al.*, 2008; Lovering *et al.*, 2011; Bellini *et al.*, 2013). En el dominio EAL se han descrito 7 residuos esenciales para la actividad PDE, dispuestos según el patrón **EALX₅₇NX₃₃EX₂EX₂₆DX₂₀KX₃₅E** (Rao *et al.*, 2008). El análisis de las posibles PDE portadoras de dominios EAL en Pto y Sme se realizó considerando que modificaciones en alguno de esos aminoácidos conservados supone la pérdida de la función PDE (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Clasificación funcional de los 21 dominios EAL identificados en proteínas de Pto DC3000. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 7 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Rao *et al.* (2008). En verde se indican los residuos no conservados.

Proteína	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	Actividad
PSPTO_0114	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_0236	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_0306	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_0406	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_0536	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_1278	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_1348	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_1483	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_1737	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_2171	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_2699	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_2757	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_2907	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_3886	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_4106	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_4208	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_4365	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_4543	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_4631	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
PSPTO_5014	EALX ₅₇ CX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-
PSPTO_A0034	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+

Tabla 16. Clasificación funcional de los 14 dominios EAL identificados en proteínas de *S. meliloti* 1021. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 7 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Rao *et al.* (2008). Se indican en verde los residuos no conservados del motivo y con espacios en blanco la ausencia de residuos conservados.

Proteína	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	Actividad
SMc00033	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc00038	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc00074	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc00887	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc00992	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc03141	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc03178	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMc03942	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMA0137	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SMA0369	AX ₃₅ E	-
SMA1548	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SM_b20447	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+
SM_b20900	DX ₂₀ KX ₃₅ E	-
SM_b21517	EALX ₅₇ DX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ SX ₂₀ KX ₃₅ E	-

La presencia de un alto número de motivos EAL en Pto y Sme (21 y 14, respectivamente) indica que estos dominios son cruciales para mantener la homeostasis del c-di-GMP en esas bacterias. De hecho, la mayoría son activos, lo que sugiere que la actividad catalítica es más importante que la hipotética actividad efectora sugerida para los motivos EAL degenerados (Guzzo *et al.*, 2009; Seshasayee *et al.*, 2010; Römling *et al.*, 2013).

Los motivos EAL presentes en Pto y Sme podrían ser esenciales en los estadios iniciales de la interacción con su hospedador, tal y como se ha descrito para otras bacterias que interactúan con plantas (Ryan *et al.*, 2006b; Mole *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2010; Mann y Wozniak, 2012). Dentro de las funciones reguladas por proteínas con dominios EAL se encuentran la expresión de distintos sistemas de secreción, la producción de factores de virulencia, la motilidad tipo *swarming*, la resistencia a estrés o la disociación de biopelículas (Hisert *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2006b; Kim y McCarter, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Guzzo *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2010). Las pectinasas secretadas a través del T2SS y el T3SS con sus efectores son los principales factores de virulencia utilizados por *Dickeya dadantii* para infectar sus plantas hospedadoras (Boccard y Chatain, 1989). La proteína EcpC, portadora de un dominio EAL, disminuye los niveles intracelulares de c-di-GMP a través de su actividad PDE, lo que estimula la secreción de pectatoliasas (vía T2SS) y la expresión de efectores secretados a través del T3SS; además, inhibe la formación de biopelículas y estimula la motilidad tipo *swimming* y *swarming* de esta bacteria (Yi *et al.*, 2010). En *V. cholerae* la actividad PDE de la proteína VieA estimula la secreción de la toxina colérica (Tischler y Camilli, 2005).

Pto y Sme poseen 1 y 3 motivos EAL degenerados, respectivamente, que no podrían hidrolizar c-di-GMP pero sí asumir funciones efectoras como las descritas en otras bacterias (Navarro *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011). En *P. fluorescens*, la secreción de la adhesina LapA, esencial para la unión de esta bacteria a su planta hospedadora, está regulada por la unión del c-di-GMP a un motivo EAL degenerado de la proteína LapD (Newell *et al.*, 2009).

1.3. Hipotéticas fosfodiesterasas portadoras de dominios HD-GYP

Las fosfodiesterasas con dominios HD-GYP forman parte de una superfamilia de fosfohidrolasas dependientes de metales denominada HD por los residuos que intervienen en la catálisis y en la unión a metales (Aravind y Koonin, 1998). Los dominios HD-GYP unen c-di-GMP y lo hidrolizan produciendo directamente, en un solo paso, dos moléculas de GMP (Ryan *et al.*, 2006b; Rao *et al.*, 2008; Lovering *et al.*, 2011). Se ha descrito una secuencia consenso para este motivo (**HDXGKX₄₇₋₅₆HHEx₂DGXGYP**), pero el papel de cada uno de esos residuos en la actividad fosfodiesterasa aún está por determinar (Galperin *et al.*, 1999; Slater *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2010a; Lovering *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013). No está claro si el motivo GYP es esencial para la actividad enzimática o es necesario para la interacción con otras proteínas. Así, la proteína Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus*, que carece de la tirosina conservada (pero también de otros residuos conservados), no parece unir c-di-GMP *in vitro* (Lovering *et al.*, 2011); sin embargo, en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* se demostró que el efecto RpfG en la activación de los genes de virulencia y motilidad ocurre gracias a su actividad PDE y a la interacción física del motivo GYP

con dos proteínas portadoras de dominios GGDEF: XC_0249 y XC_0420 (Ryan *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2010a; Ryan y Dow, 2010b). El análisis de las posibles PDE portadoras de dominios HD-GYP en Pto y Sme se realizó considerando que modificaciones en alguno de esos aminoácidos conservados supone la pérdida de la función PDE (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. Clasificación funcional de los 3 dominios HD-GYP identificados en proteínas de Pto DC3000. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 12 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Ryan *et al.* (2010a) y Römling *et al.* (2013). En verde se indican los residuos no conservados.

Proteína	HDXGKX ₄₇₋₅₆ HHEX ₂ DGXGYP	Actividad
PSPTO_1152	HDV G KX ₄₈ H HEKIDG S GYP	+
PSPTO_1270	HD A PVX ₄₈ S FRSYRE Q GYP	-
PSPTO_2897	HD R WPX ₄₉ V IWDL C HYGYP	-

Tabla 18. Clasificación funcional del dominio HD-GYP identificado en una proteína de *S. meliloti* 1021. Se ha determinado la presencia o ausencia de 12 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Ryan *et al.* (2010a) y Römling *et al.* (2013). Se indican en verde los residuos no conservados del motivo.

Proteína	HDXGKX ₄₇₋₅₆ HHEX ₂ DGXGYP	Actividad
SMa0392	HD L TE X ₅₄ L AKPV G LDGYP	-

Según Dow *et al.* (2006) y la página web de M.Y. Galperin (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html) existe una única proteína con dominio HD-GYP en Pto (PSPTO_1152) y no existen proteínas con dominios HD-GYP en Sme. Según nuestros análisis, la única proteína con dominios HD-GYP que, en principio y dada su secuencia podría ser activa, es PSPTO_1152. No se han descrito aún proteínas con dominios HD-GYP catalíticamente inactivos que funcionen como receptores de c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). Es posible que PSPTO_1270, PSPTO_2897 y SMa0392 pudieran pertenecer a esta categoría.

Teniendo en cuenta el bajo número de proteínas con motivos HD-GYP tanto en Pto como en Sme, es posible que estos dominios no jueguen un papel relevante en estas cepas y, al igual que se ha observado en otras bacterias como *C. crecentus*, *Y. pestis*, *S. enterica* y *Mesorhizobium*, sean los dominios EAL los responsables únicos o casi exclusivos de la actividad PDE (Aravind y Koonin, 1998; Galperin *et al.*, 2010).

1.4. Proteínas efectoras con dominios PilZ

Los dominios PilZ fueron los primeros receptores de c-di-GMP identificados en bacterias. En primer lugar, se predijo su existencia en el componente glucosiltransferasa del complejo multienzimático de la celulosa sintasa de *G. xylinus* (Ross *et al.*, 1987; Amikam y Galperin, 2006). Tras la sobreexpresión y purificación de los dominios PilZ de la subunidad BcsA de *G. xylinus* y de la proteína YcgR de *E. coli*, se demostró que unían c-di-GMP (Ryjenkov *et al.*, 2006). Posteriormente, se han identificado otras proteínas

con dominios PilZ (PlzC y PlzD en *V.cholerae*, DgrA y DgrB en *C. crescentus*, PA4608 o Alg44 en *P. aeruginosa*) que, tras unir de manera específica c-di-GMP, sufren cambios conformacionales que modulan su actividad y/o la de otras proteínas (Christen *et al.*, 2007; Merighi *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007; Ramelot *et al.*, 2007). Mediante mutagénesis de los residuos conservados de este dominio y tras la obtención de varias estructuras de dominios PilZ, se ha establecido una secuencia consenso para la unión de c-di-GMP: **RX₃RX₂₀₋₃₀[D/N]X[S/A]X₂G** (Ryjenkov *et al.*, 2006; Merighi *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007; Ramelot *et al.*, 2007; Römling *et al.*, 2013). El análisis de las posibles proteínas portadoras de dominios PilZ en Pto y Sme se realizó considerando que modificaciones en alguno de esos aminoácidos conservados provoca la pérdida de la capacidad de unión a c-di-GMP (Tablas 19 y 20). En cualquier caso, el número de proteínas con dominios PilZ identificadas en rizobios y *Pseudomonas* es muy pequeño (Tablas 12, 19 y 20), sobre todo en relación al elevado número de proteínas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP, lo que sugiere que probablemente la mayoría de efectores del c-di-GMP presentan dominios aún desconocidos.

Tabla 19. Clasificación funcional de los 8 dominios PilZ identificados en proteínas de Pto DC3000. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 5 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Ryjenkov *et al.* (2006) y Römling *et al.* (2013). En verde se indican los residuos no conservados.

Proteínas con función conocida	Proteína	RX ₃ RX ₂₀₋₃₀ [D/N]X[S/A]X ₂ G	Actividad
WssB	PSPTO_1027	RTEPRX ₂₂ DFSQTG	+
Alg44	PSPTO_1241	RQHARX ₂₂ DL SAGG	+
YcgR	PSPTO_1923	RNAFRX ₂₇ DI SATG	+
	PSPTO_2108	REYYRX ₂₄ DTSTLF	-?
PilZ	PSPTO_2116	RDYIRX ₂₁ DLSSSG	+
	PSPTO_3825	PVAGR ₂₅ NTARNL	-
	PSPTO_4335	RKIERX ₂₂ NVSGEG	+
	PSPTO_4639	RRFKRX ₂₁ DL SLKG	+

Tabla 20. Clasificación funcional de los 2 dominios PilZ identificados en proteínas de *S. meliloti* 1021. Dicha clasificación se ha establecido tras determinar la presencia o ausencia de 5 residuos esenciales (resaltados en color rojo) según Ryjenkov *et al.* (2006) y Römling *et al.* (2013).

Proteína	RX ₃ RX ₂₀₋₃₀ [D/N]X[S/A]X ₂ G	Actividad
SMc00999	RRHDRX ₂₃ DL SL SG	+
SMc00507	RASSRX ₂₁ DL SDEG	+

WssB codifica la subunidad catalítica de la celulosa sintasa y posee además un dominio PilZ que, tal y como se ha observado en otras bacterias, estaría implicado en la regulación alostérica de la actividad de esta enzima (Ross *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 2013). Otra proteína con un dominio PilZ es PSPTO_1923, cuyo ortólogo en otras bacterias como *P. putida*, *S. enterica* o *E. coli* es YcgR. Esta proteína es capaz de unir c-di-GMP en presencia de altos niveles de este segundo mensajero, con lo cual se activa uniéndose al

motor del flagelo e inhibiendo el movimiento flagelar; es decir, actúa como un freno molecular (Ryjenkov *et al.*, 2006; Wolfe y Visick, 2008). PSPTO_1241 (Alg44) se localiza en la membrana interna y está implicada en la producción y secreción del precursor del alginato en *P. aeruginosa*. La producción de este polisacárido ocurre tras la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de Alg44 activando alostéricamente a la alginato sintasa Alg8 para que a partir de ácido GDP-manurónico sintetice ácido poli-β-D-manurónico. Una vez en el periplasma, este polímero se modifica y exporta a través de la membrana externa (Whitney y Howell, 2013).

De manera similar a los dominios catalíticos que sintetizan o hidrolizan c-di-GMP, los PilZ también existen como activos e inactivos, siendo estos últimos incapaces de unir c-di-GMP debido a modificaciones en su secuencia canónica. Este tipo de dominios a pesar de haber perdido su capacidad de unir c-di-GMP han adquirido funciones accesorias relacionadas con interacciones proteína-proteína (Guzzo *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2012; Römling *et al.*, 2013). Irónicamente, la proteína PilZ de distintas bacterias también pertenece a esta categoría. Por ejemplo, en *Xanthomonas axonopodis* pv. citri la proteína PilZ a pesar de no unir c-di-GMP es necesaria para la motilidad tipo *twitching*, a través de la interacción con FimX (GGDEF/EAL-) y PilB, una ATPasa necesaria para la polimerización del *pilus* tipo IV (Guzzo *et al.*, 2009; 2013). En *P. aeruginosa* la proteína PilZ (PA2960) también pertenece a esta categoría y se encuentra implicada en la biogénesis del *pilus* tipo IV, probablemente siguiendo un mecanismo molecular similar al descrito en *Xanthomonas* (Li *et al.*, 2009). Según nuestras observaciones la proteína PSPTO_3825 de Pto también pertenece a esta categoría (Tabla 19), y debido a que Pto presenta en su genoma los genes necesarios para la formación de *pili* tipo IV (Roine *et al.*, 1998) es probable que PSPTO_3825 también se encuentre implicada en interacciones proteína-proteína regulando procesos en los que intervienen estos apéndices. En Sme hay dos proteínas con dominios PilZ: SMc00999 y SMc00507 (Tabla 20). Ambas son proteínas de pequeño tamaño de función desconocida y la proteína SMc00507, por su parte, presenta un dominio adicional denominado GH97_N, según Pfam, con posible actividad glucosil-hidrolasa (Dagnall *et al.*, 1995; Naumoff, 2005), por lo que podría tener un papel en la síntesis de EPSs. De todos modos, es muy complicado aventurar la función de estas proteínas hipotéticas, ya que se ha observado que proteínas con dominios PilZ bien caracterizadas están implicadas en la regulación de la motilidad, la síntesis y la translocación de polisacáridos y en la unión al ADN, por lo que parece claro que el dominio PilZ funciona como un módulo versátil regulando diversas actividades en función de los niveles de c-di-GMP (revisado en Römling *et al.*, 2013).

2. Presencia de dominios adicionales asociados a dominios GGDEF y/o EAL

Es bastante común que los motivos GGDEF y EAL estén presentes en proteínas multidominio junto con dominios GGDEF o EAL adicionales u otros que participan en la detección de estímulos ambientales y/o en la transducción de señales, como PAS, HAMP, GAF y REC (Galperin *et al.*, 2001a; De *et al.*, 2009; Römling *et al.*, 2013). Por esta razón, se procedió a identificar todas las proteínas de Pto y Sme que

poseían motivos GGDEF y EAL en tándem y/o en asociación con otros dominios. Se debe mencionar que no hemos encontrado proteínas con dominios GGDEF y HD-GYP adyacentes, ni en Pto ni en Sme.

2.1. Proteínas con dominios GGDEF y EAL en tándem

El análisis mostró que más de la mitad de las proteínas con motivos GGDEF de Pto y Sme portan dominios EAL en tándem (54% y 67%, respectivamente) y la proporción es mucho mayor si consideramos las proteínas con motivos EAL asociados a dominios GGDEF: 90% en Pto y 86% en Sme (Tablas 12, 21 y 22).

Inicialmente se pensaba que en este tipo de proteínas solo uno de los dos dominios era activo (Seshasayee *et al.*, 2010); sin embargo, posteriormente se describieron proteínas bifuncionales, tales como BphG1 de *Rhodobacter sphaeroides*, ScrC de *Vibrio parahaemolyticus*, MSDGC-1 de *Mycobacterium smegmatis* o Lpl0329 de *Legionella pneumophila* (Tarutina *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008; Levet-Paulo *et al.*, 2011; Bharati *et al.*, 2012).

Tabla 21. Clasificación funcional de las proteínas de Pto DC3000 con dominios GGDEF y EAL en tándem. Dicha clasificación funcional de proteínas híbridas se ha establecido atendiendo los criterios de Christen *et al.* (2006) para los dominios GGDEF y de Rao *et al.* (2008) para los dominios EAL. Se indican en verde los residuos no conservados de los motivos.

Proteína	GGDEF	Motivos	GGDEF		EAL
			I	A	
PSPTO_0114	DAGDQIARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
PSPTO_0306	GNETTLARPGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
PSPTO_0406	SPTDVLARFASNEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
PSPTO_0536	RDIDTVARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_1278	NASDTLGRVDGDQF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
PSPTO_1348	RANDVLARIGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_1737	RSDTLARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_2171	RQEDTVARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_2699	REEDLLARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_2757	HLHDTLARVGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
PSPTO_2907	SNTVHVSRLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
PSPTO_3886	PSRDFVGHIGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
PSPTO_4106	RVQDVVARFVGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
PSPTO_4208	RAGDTVARLSANEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	-	+
PSPTO_4365	GRLGALARLGGDQF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
PSPTO_4543	PRTCSLYKVGPTRF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
PSPTO_4631	SADDTVARMGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
PSPTO_5014	RPYDVLARIGGDEF	EALX ₅₇ CX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	-
PSPTOA0034	SDTVHVSRLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+

Tabla 22. Clasificación funcional de las proteínas de Sme 1021 con dominios GGDEF y EAL en tándem. Dicha clasificación funcional de proteínas híbridas se ha establecido atendiendo los criterios de Christen *et al.* (2006) para los dominios GGDEF y de Rao *et al.* (2008) para los dominios EAL. Se indican en verde los residuos no conservados de los motivos y con espacios en blanco la ausencia de residuos conservados.

Proteína	Motivos		GGDEF		EAL
	GGDEF	EAL	I	A	
SMc00033	GEEKFLGHVGGDDF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SMc00038	RRSDSVVRVGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
SMc00074	RPQDTLARLGGDQF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	-	+
SMc00887	PEGATVTRTADDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SMc00992	QEPAILARLSGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SMc03141	MLARLKTREQAADL	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SMc03178	RQDDFVARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	+	+	+
SMc03942	GSEAI AARLMGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SMa0137	AAGAAISRIGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
SMa1548	RTTETVARLGGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	+
SM_b20447	RDRFAYRLAGDEF	EALX ₅₇ NX ₃₃ EX ₂ EX ₂₆ DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	-	+
SM_b20900	GEADTIARLGGDEF	DX ₂₀ KX ₃₅ E	-	+	-

Los análisis *in silico* realizados en nuestro laboratorio han revelado que el 63% de las proteínas híbridas en Pto y el 33% de Sme parecen tener los dos dominios activos (Tabla 23). Estos dominios parecen actuar alternativamente en algunos casos. Así, en las proteínas BphG1 de *R. sphaeroides* y Lpl0329 de *Legionella pneumophila* en un momento determinado prevalece una de las dos actividades dependiendo de las condiciones ambientales o celulares y gracias a la acción de otros dominios presentes en la misma proteína (Tarutina *et al.*, 2006; Levet-Paulo *et al.*, 2011), mientras que en ScrC de *V. parahaemolyticus*, la actividad DGC o PDE depende de otras proteínas que interaccionan con ella (Ferreira *et al.*, 2008; Trimble *et al.*, 2011). MSDGC-1 de *M. smegmatis* es capaz de sintetizar e hidrolizar c-di-GMP *in vitro*, pero aún se desconocen (si existen) los mecanismos que regulan ambas actividades *in vivo* (Bharati *et al.*, 2012). También es posible que la alternancia de función esté supeditada al estado de multimerización de la proteína lo que, a su vez, parece depender de dominios adicionales presentes en la misma o en otras proteínas (Seshasayee *et al.*, 2010). En este sentido se ha observado que la mayoría de las proteínas con motivos GGDEF y EAL de Pto y Sme poseen dominios adicionales (Figura 20). Un ejemplo es MorA, una proteína presente en numerosas cepas de la familia Pseudomonadaceae que presenta dominios GGDEF y EAL en tándem, ambos hipotéticamente activos, asociados a dominios sensores PAS en el extremo N-terminal. En *P. putida*, un mutante carente de MorA presenta mayor motilidad tipo *swimming* que la cepa silvestre además de una deficiencia en la formación de biopelículas, lo que sugiere que estaría actuando como DGC en las condiciones ensayadas (Choy *et al.*, 2004).

Tabla 23. Distribución de los sitios catalíticos y reguladores en proteínas con dominios GGDEF/EAL en tándem. Relación entre dominios catalíticos (GGDEF y EAL) y alostéricos (RXXD) en proteínas GGDEF/EAL en Sme 1021 y Pto DC3000.

Pseudomonas syringae pv. tomato

		GGDEF					
		A ⁺			A ⁻		
EAL ⁺	12 (63%)	I ⁺ A ⁺	6 (32%)	6 (32%)	I ⁺ A ⁻	1 (5%)	
		I ⁻ A ⁺	6 (32%)		I ⁻ A ⁻	5 (26%)	
EAL ⁻	1 (5%)	I ⁺ A ⁺	1 (5%)	0 (0%)	I ⁺ A ⁻	0 (0%)	
		I ⁻ A ⁺	0 (0%)		I ⁻ A ⁻	0 (0%)	

Sinorhizobium meliloti 1021

		GGDEF					
		A ⁺			A ⁻		
EAL ⁺	4 (33%)	I ⁺ A ⁺	2 (17%)	7 (58%)	I ⁺ A ⁻	1 (8%)	
		I ⁻ A ⁺	2 (17%)		I ⁻ A ⁻	6 (50%)	
EAL ⁻	1 (8%)	I ⁺ A ⁺	0 (0%)	0 (0%)	I ⁺ A ⁻	0 (0%)	
		I ⁻ A ⁺	1 (8%)		I ⁻ A ⁻	0 (0%)	

Por otra parte, en Pto existen 7 proteínas GGDEF/EAL con uno de los dominios degenerados y en Sme 8, por lo que en teoría, tendrían solo actividad DGC o PDE (Tablas 21-23). Los únicos motivos EAL hipotéticamente inactivos, presentes en proteínas híbridas de Pto (PSPTO_5014) y Sme (Sm_b20900), se encuentran asociados a un motivo GGDEF activo (Tablas 21 y 22), por lo que estos motivos EAL, a pesar de no hidrolizar el c-di-GMP, podrían unirlo regulando de algún modo la actividad DGC de la proteína. La proteína PSPTO_5014 (REC-PAS-GGDEF-EAL) presenta además un sitio RXXD activo, lo que sugiere que, en este caso, la actividad DGC estaría regulada alostéricamente por la unión no competitiva del c-di-GMP al sitio I del dominio GGDEF y el motivo EAL degenerado podría estar implicado en interacciones proteína-proteína moduladas por la unión del c-di-GMP al sitio I y/o por los dominios REC y PAS localizados en el extremo N-terminal de la proteína, de forma similar a lo observado en otras bacterias (Guzzo *et al.*, 2009; Römling *et al.*, 2013).

En el caso de proteínas GGDEF/EAL⁺, la actividad PDE podría estar modulada por el motivo GGDEF degenerado, como se ha descrito en PdeA (CC_3396) de *C. crescentus* o BifA de *P. aeruginosa* (Christen *et al.*, 2005; Kuchma *et al.*, 2007). En PdeA se ha demostrado además que la actividad PDE está sometida a control alostérico por GTP a través de su unión al motivo GGDEF degenerado (Christen *et al.*, 2005). En BifA, cuyo ortólogo en Pto es PSPTO_4365, ambos dominios (GGDEF/EAL⁺) son necesarios para la actividad PDE *in vivo* (Kuchma *et al.*, 2007).

La función de las proteínas cuyos dominios GGDEF y EAL son catalíticamente inactivos es aún incierta, aunque parece que han evolucionado para llevar a cabo funciones reguladoras. Una de estas funciones implicaría la unión (pero no el procesamiento) del sustrato: la unión de GTP a los sitios A de los dominios GGDEF inactivos (Christen *et al.*, 2005) o la unión de c-di-GMP a sus sitios de unión en dominios

EAL enzimáticamente inactivos (Navarro *et al.*, 2009; Newell *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2011). Otro conjunto de funciones incluiría su participación en interacciones proteína-proteína o proteína-ARN (Suzuki *et al.*, 2006; Tschowri *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2012). En Pto y Sme no se encontraron proteínas que *a priori* carezcan de las dos actividades DGC y PDE (Tablas 21-23).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, se ha considerado que las proteínas que portan el motivo GG[D/E]EF son DGC activas, lo que implica que en el centro del motivo puede estar presente un glutámico o un aspártico (Jenal y Malone, 2006). Un estudio realizado con las 33 proteínas con dominios GGDEF en *P. aeruginosa* demostró que la presencia de uno u otro residuo no parece ser al azar: proteínas con dominios GGDEF que no se encuentran asociados a dominios EAL presentan mayoritariamente el motivo GGEEF, mientras que en proteínas con los dos dominios en tándem (GGDEF y EAL) predomina el motivo GGDEF. Esto sugiere que proteínas con dominios GGDEF han evolucionado independientemente de aquellas que presentan motivos GGDEF y EAL en tándem (Kulasekara *et al.*, 2006). En Sme, pero sobre todo en Pto, hemos podido observar la misma tendencia que en *P. aeruginosa*: los dominios GGDEF de proteínas con actividad DGC exclusivamente presentan mayoritariamente la secuencia GGEEF (12 motivos GGEEF y 1 GGDEF en Pto; 4 GGEEF y 2 GGDEF en Sme). Sin embargo, en las proteínas híbridas predomina la secuencia GGDEF (0 GGEEF y 13 GGDEF en Pto; 0 GGEEF y 5 GGDEF, en Sme, Figura 19). Algunos autores han propuesto que los motivos GGEEF son más activos en la síntesis de c-di-GMP que los GGDEF (Seshasayee *et al.*, 2010) y, en este sentido, el motivo GGEEF se encuentra mayoritariamente asociado a un sitio regulador alostérico (I⁺) en Pto, mientras que el motivo GGDEF se encuentra asociado tanto a sitios I⁺ como I⁻ (Tabla 24).

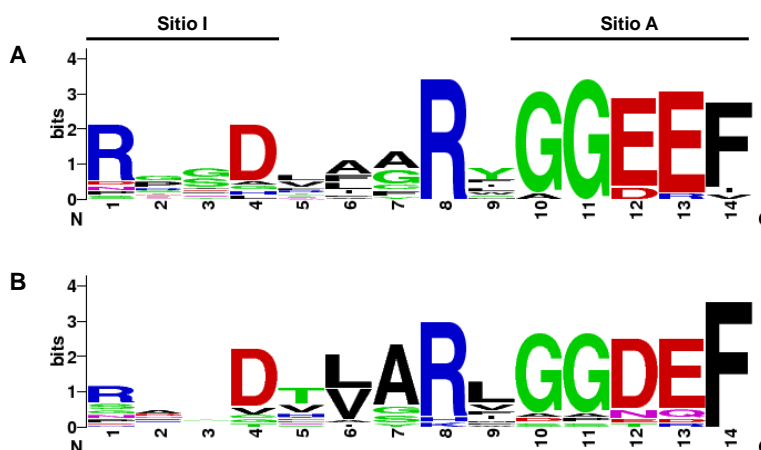


Figura 19. Logo de la secuencia de los dominios DGC de proteínas en Pto. El logo representa gráficamente la frecuencia de los residuos presentes en los sitios catalíticos (A) y reguladores (I) de proteínas en Pto con un dominio único GGDEF (A) en comparación con proteínas híbridas GGDEF/EAL (B).

Tabla 24. Distribución de los sitios catalíticos y reguladores en proteínas con dominios DGC. Relación entre los dominios catalíticos (GGDEF y GGEEF) y alostéricos (RXXD) en proteínas DGC y DGC/EAL en Pto DC3000 y Sme 1021.

		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato		<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	
		GGDEF	GGEEF	GGDEF	GGEEF
DGC	I ⁺	1	9	2	2
	I ⁻	0	3	0	2
DGC/EAL	I ⁺	7	0	2	0
	I ⁻	6	0	3	0

En resumen, se observa que los genomas de bacterias que interactúan con plantas, tanto simbióticas como patógenas, codifican una gran variedad de proteínas que interactúan con c-di-GMP y presentan actividad catalítica y efectora, lo que pone de manifiesto la alta complejidad de los sistemas de regulación mediados por este segundo mensajero. Los resultados de los análisis *in silico* sugieren que, tanto en Sme como en Pto, los dominios GGDEF han evolucionado de forma diferente dependiendo de si se encuentran en tándem con dominios EAL o no. De este modo, al igual que se ha observado en otras bacterias, las proteínas únicamente con actividad DGC hacen uso mayoritariamente del motivo GGEEF, relacionado con un alta actividad DGC (Seshasayee *et al.*, 2010). En ese sentido, en Pto y Sme el sitio de regulación alostérica (I⁺) es más frecuente en proteínas únicamente con actividad DGC. Por su parte, las proteínas híbridas presentan mayoritariamente el motivo GGDEF, encontrándose asociado tanto a sitios I⁺ como I⁻.

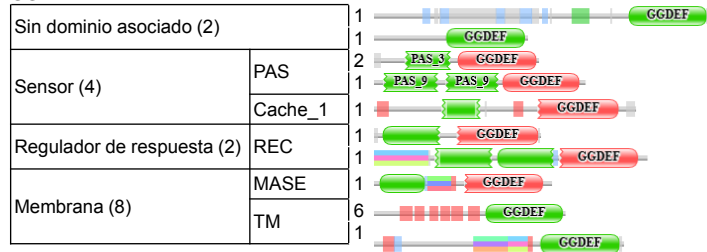
2.2. Presencia de otros dominios

Muchas de las proteínas implicadas en la síntesis y degradación del c-di-GMP combinan los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP con otros sensores o de señalización, lo que sugiere la existencia de una transducción de señales que modula las actividades DGC y PDE (Mills *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013).

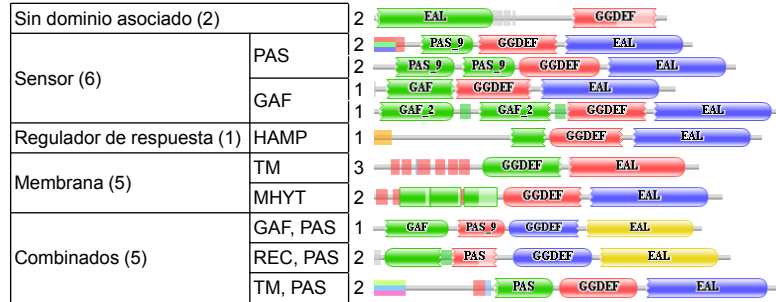
Analizando qué otros dominios estaban presentes en las proteínas con actividad DGC y PDE (Figura 20), observamos que, de las 35 proteínas de Pto con dominios GGDEF, 31 poseen además distintos dominios sensores (Cache_1, GAF o PAS), de membrana (MASE, MHYT o TM) o reguladores de respuesta (HAMP o REC). Asimismo, de las 18 proteínas de Sme con dominios GGDEF, 13 se encuentran asociados a distintos dominios sensores (CBS, CHASE, GAF o PAS), de membrana (7TMR-DISM, MHYT o TM) o reguladores de respuesta (HAMP o REC). Esto sugiere que la actividad DGC en estas dos bacterias se encuentra regulada por distintos estímulos ambientales y que la síntesis de c-di-GMP se encuentra frecuentemente vinculada a la membrana celular. Estudios bioquímicos y genéticos han mostrado que proteínas con dominios GGDEF o GGDEF/EAL en el extremo C-terminal suelen tener asociados dominios sensores en el extremo N-terminal, encargados de activar la síntesis de c-di-GMP tras el reconocimiento de una amplia gama de señales ambientales (Cotter y Stibitz, 2007; Seshasayee *et al.*, 2010).

P. syringae pv. *tomato*

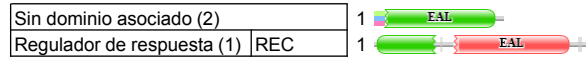
GGDEF



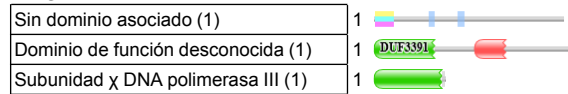
GGDEF/EAL



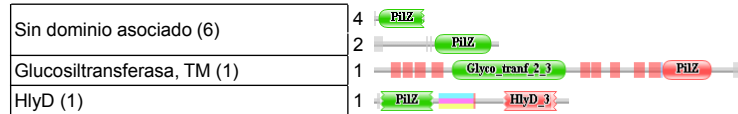
EAL



HD-GYP

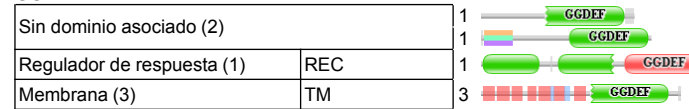


PilZ

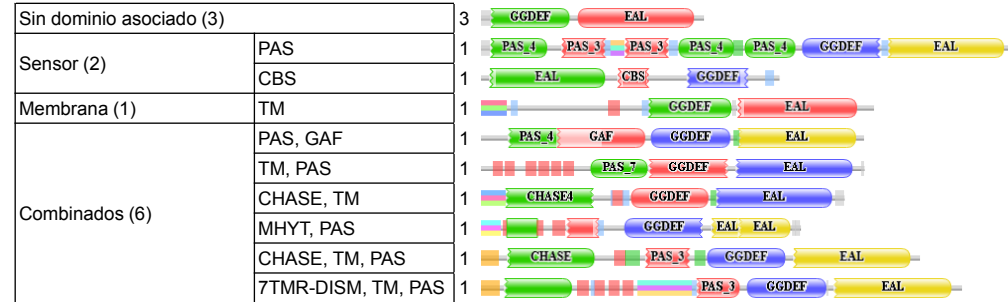


Sinorhizobium meliloti 1021

GGDEF



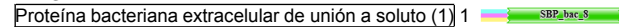
GGDEF/EAL



EAL



HD-GYP



PilZ



Figura 20. Organización de dominios en proteínas con motivos GGDEF, GGDEF/EAL, EAL, HD-GYP y PilZ en Pto y Sme. Los números indican el número de proteínas con esa organización específica de dominios.

También se observó que el 37% y el 50% de las proteínas híbridas en Pto y Sme, respectivamente, se encuentran asociadas a membrana (Figura 20). Esto sugiere que buena parte de la actividad de síntesis y degradación del c-di-GMP en Pto y Sme ocurre en la membrana plasmática, de forma similar a lo observado en otras bacterias, como *K. pneumoniae* (Cruz *et al.*, 2012). Igualmente, se ha postulado que en proteínas híbridas que presentan ambas actividades (PDE⁺/DGC⁺), la naturaleza del estímulo percibido por el dominio sensor podría determinar la alternancia de estas actividades (Tarutina *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2008; Seshasayee *et al.*, 2010; Levet-Paulo *et al.*, 2011).

El dominio sensor más abundante, tanto en Pto como en Sme y sobre todo en proteínas con dominios GGDEF/EAL en tándem, es el PAS, que está implicado en la detección de cambios en los niveles de oxígeno, potenciales redox y luz (Galperin *et al.*, 2001a). Sin embargo, este dominio sensor no aparece tan frecuentemente en proteínas con una sola actividad, ya sea PDE o DGC (Figura 20). También existen 2 y 1 proteínas híbridas en Pto y Sme, respectivamente, portadoras de dominios MHYT (Figura 20), implicados en detectar niveles de O₂, NO o CO (Galperin *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2013). En *P. aeruginosa* se ha demostrado que los dominios MHYT de las proteínas híbridas MucR y NbdA están implicados en la detección de NO, provocando la dispersión de las biopelículas gracias a la inducción de su actividad PDE (Li *et al.*, 2013). Esto sugiere que, probablemente tanto en Pto como en Sme, las actividades DGC y PDE presentes en esas proteínas generen cambios fisiológicos en respuesta a los niveles de NO.

Tanto en Pto como en Sme los motivos EAL no están ligados a dominios sensores o de membrana (Figura 20); por tanto, la asociación de un dominio sensor con otro EAL parece ocurrir únicamente en presencia de un dominio GGDEF. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros grupos bacterianos como en γ -proteobacterias, donde las proteínas que poseen solo dominios EAL carecen de dominios sensores, pero las proteínas híbridas presentan dominios sensores de distintos tipos (Seshasayee *et al.*, 2010). En Pto existe una proteína con un motivo EAL asociado a un dominio REC (PSPTO_1483). Este tipo de dominios son susceptibles de fosforilación actuando como reguladores de respuesta en sistemas de dos componentes, lo que sugiere que la actividad PDE de esta proteína se encuentra controlada por la percepción de un estímulo ambiental.

Los motivos HD-GYP, tanto en Pto como en Sme, no se encuentran asociados a dominios sensores o de membrana, sino a dominios de función desconocida o con otras funciones asignadas (como subunidad χ de la DNA polimerasa III o proteína bacteriana extracelular de unión a soluto), cuya actividad probablemente regulen en respuesta a los niveles intracelulares de c-di-GMP (Figura 20). Proponemos que estas proteínas poseen actividad efectora o moduladora dado que todos los hipotéticos dominios HD-GYP parecen inactivos. Sin embargo y a diferencia del papel efector demostrado para proteínas con motivos EAL degenerados, hasta la fecha no existen evidencias del papel efector de los dominios HD-GYP degenerados (Römling *et al.*, 2013). La única proteína HD-GYP supuestamente activa (PSPTO_1152; Tabla 17), también posee otro dominio de función desconocida.

Del mismo modo, los motivos PilZ de Pto y Sme no se encuentran asociados a dominios sensores, indicando que estas proteínas no se encuentran implicadas en la traducción de señales. Esto concuerda con la función asignada a los dominios PilZ, que responden a un segundo estímulo asociado con un

incremento en los niveles de c-di-GMP regulando la actividad de las proteínas en las que se encuentran o de otras con las que interaccionan (Ross *et al.*, 1987; Guzzo *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2012; Fujiwara *et al.*, 2013). En este sentido, ninguna proteína con dominios PilZ de Sme presenta ningún otro dominio y en Pto tan solo dos presentan otros dominios: PSPTO_1241 y PSPTO_1027 (Figura 20).

Alg44 (PSPTO_1241) es una proteína transmembrana con un dominio citoplasmático PilZ en el extremo N-terminal y un dominio periplásmico HlyD en el extremo C-terminal, similar a los presentes en proteínas de fusión de membrana (*membrane fusion protein*, MFP) que forman parte del T1SS o de transportadores RND. En *P. aeruginosa* se ha observado que la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de Alg44 activa alostéricamente a la alginato sintasa Alg8, que forma parte del complejo multiproteico que polimeriza y la secreta el alginato (Rehman *et al.*, 2013).

WssB (PSPTO_1027) es la subunidad catalítica de la celulosa sintasa y posee un dominio PilZ junto con otro con actividad glucosiltransfera (Mann y Wozniak, 2012). Como ya se mencionó en el apartado 1.4 y se discutirá más ampliamente en el Capítulo IV, el dominio PilZ es activo (Tabla 19), por lo que al unir c-di-GMP estimularía la actividad celulosa sintasa de la proteína (Ross *et al.*, 1987; Mann y Wozniak, 2012; Fujiwara *et al.*, 2013).

3. Implicaciones de las proteínas que interaccionan con c-di-GMP en el estilo de vida de bacterias mutualistas y patogénicas de plantas

Una vez identificadas y clasificadas las proteínas que interaccionan con c-di-GMP se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre diversos patovares del complejo *P. syringae* y distintas especies y biovares de rizobios empleando la herramienta *Gene cluster* del servidor KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), que agrupa genes según su homología y organización génica (ver apartado 3.5.4. de Materiales y Métodos). Así, se ha intentado determinar qué proteínas son importantes para un determinado estilo de vida o tipo de interacción con el hospedador tras clasificarlas de acuerdo a los siguientes criterios (Tablas 25 y 26):

- a. Presentes en todos los genomas analizados
- b. Presentes sólo en bacterias beneficiosas o sólo en patógenas.
- c. Presentes sólo en rizobios o sólo en *P. syringae*
- d. Presentes en los tres patovares analizados de *P. syringae* o en todas las especies de rizobios.
- e. Específicas de especie/biovar/patovar

El estudio comparativo de dominios que interaccionan con el c-di-GMP en Pto muestra que existe un gran número de proteínas que portan estos dominios conservados en todos los miembros de la familia Pseudomonadaceae (Tabla 25). Estos dominios conservados podrían estar involucrados en procesos fisiológicos comunes a todas las *Pseudomonas*, tales como división celular, formación de biopelículas, motilidad o supervivencia.

Una de las proteínas conservadas en las distintas *Pseudomonas* cuya función ha sido estudiada es BifA de *P. aeruginosa* (PA4367, homóloga a PSPTO_4365 de Pto), una proteína híbrida cuyo dominio GGDEF se encuentra degenerado, conservando intacta la actividad PDE (GGDEF-/EAL⁺). BifA está

implicada en la transición de un estilo de vida sésil a otro mótil asociado con la expresión de factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Kuchma *et al.*, 2007). Su presencia en todas las cepas de *Pseudomonas* sugiere que la actividad PDE de BifA podría ser un mecanismo común y clave en la regulación del estilo de vida de estas bacterias mediante el control de la expresión de factores de virulencia y/o la disociación de biopelículas.

PSPTO_2757, cuyo ortólogo en *P. aeruginosa* es MucR (PA1727), es otra de las proteínas conservadas en *Pseudomonas* que ha sido caracterizada. Porta dominios GGDEF y EAL hipotéticamente activos (GGDEF⁺/EAL⁺) en su extremo C-terminal y 7 dominios TM en el extremo N-terminal asociados a un dominio sensor MHTY. En *P. aeruginosa* MucR está implicada en la regulación de la síntesis de alginato y en la dispersión de las biopelículas inducida por NO (Hay *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta la alta similitud entre MucR y PSPTO_2757 (59% de identidad y 73% de similitud), es muy posible que esta proteína cumpla una función similar en Pto.

Otra proteína conservada en *Pseudomonas* es PSPTO_4631, cuyo ortólogo en *P. aeruginosa* es MorA (PA4367). Esta proteína presenta hipotéticamente tanto actividad DGC como PDE (GGDEF⁺/EAL⁺) en sendos dominios localizados en el extremo C-terminal. En el extremo N-terminal porta dos dominios TM y 4 dominios PAS, lo que sugiere que esta proteína multidominio se encuentra localizada en la membrana y que su actividad DGC o PDE probablemente esté modulada por los dominios sensores. Sin embargo, hay que tener cuidado a la hora de predecir la función de PSPTO_4631, ya que mutantes carentes de *morA* en distintas cepas de *Pseudomonas* presentan distintos fenotipos en motilidad y formación de biopelículas, lo que indica que sistemas de señalización conservados en un mismo género pueden tener funciones celulares diferentes específicas de especie o cepa (Choy *et al.*, 2004).

Otra proteína, esta vez con actividad PDE, presente en todas las especies de *Pseudomonas* estudiadas es PSPTO_1483, cuyo ortólogo en *P. aeruginosa* es el regulador de respuesta RocR (PA3947). Esta proteína presenta un dominio REC en su extremo N-terminal y un motivo EAL en su extremo C-terminal cuya actividad PDE ha sido demostrada (Rao *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2009). A pesar de que los porcentajes de identidad y similitud entre PSPTO_1483 y RocR son relativamente bajos (33% y 47%, respectivamente), ambas proteínas presentan la misma arquitectura (REC-EAL), por lo que podrían tener la misma función aunque controlando procesos distintos, ya que RocR regula la expresión del operón *cup*, implicado en la síntesis de fimbrias, y estos genes no se encuentran en el genoma de Pto.

Tabla 25. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas que interactúan con el c-di-GMP de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia al nombre del ORF en el genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican las proteínas presentes en *Pseudomonas* patógenas de plantas exclusivas de la especie *P. syringae*; en verde, las que se encuentran solo en *Pseudomonas* que interactúan con plantas, tanto beneficiosas como patógenas; en azul, las proteínas presentes en patógenos de plantas y animales, y en rojo, las que aparecen en todas las especies analizadas del género *Pseudomonas*. Pto, *P. syringae* pv tomato; Pph, *P. syringae* pv phaseolicola; Psy, *P. syringae* pv. *syringae*; Pp, *P. putida*; Pfl, *P. fluorescens*; Pae, *P. aeruginosa*. En el apéndice se detallan las proteínas indicadas en la tabla, pero organizadas por tipos. —→

	Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos
	Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1
GGDEF	PSPTO_1004	PSPPH_0905	Psyr_0870	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_1278	PSPPH_1166	Psyr_1098	-	-	-
GGDEF	PSPTO_1346	PSPPH_1229	Psyr_1157	-	-	-
HD-GYP	PSPTO_1152	PSPPH_1043	Psyr_0994	-	-	-
HD-GYP	PSPTO_2897	PSPPH_2482	Psyr_2701	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_1348	-	Psyr_1159	-	-	-
GGDEF	PSPTO_2591	PSPPH_2908	Psyr_2281	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_2699	PSPPH_2590	Psyr_2432	-	-	-
GGDEF	PSPTO_2807	PSPPH_2692	Psyr_2535	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_2907	PSPPH_2472	Psyr_2711	-	-	-
GGDEF	PSPTO_3796	-	Psyr_1684	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_4543	PSPPH_4247	Psyr_4221	-	-	-
GGDEF/EAL	PSPTO_A0034	PSPPH_A0029 PSPPH_A0099 PSPPH_3495	Psyr_2711	-	-	-
EAL	PSPTO_0236	PSPPH_5019	Psyr_0171	-	PFLU0263	-
GGDEF	PSPTO_0505	PSPPH_4713	Psyr_4678	PP_0369	PFLU5608	-
PiiZ	PSPTO_1027	-	-	PP_2635	PFLU0301	-
GGDEF	PSPTO_1305	PSPPH_1193	Psyr_1125	PP_0798	PFLU0956	-
GGDEF	PSPTO_1616	PSPPH_1489	Psyr_3763	-	PFLU4782	-
GGDEF/EAL	PSPTO_2171	PSPPH_1950	Psyr_1981	PP_1983	PFLU4198	-
GGDEF	PSPTO_2313	PSPPH_2080	Psyr_2110	PP_2097	PFLU4600	-
GGDEF	PSPTO_3243	PSPPH_2993	-	-	PFLU3699	-
GGDEF/EAL	PSPTO_4208	PSPPH_3939	Psyr_3942	-	PFLU1083	-
GGDEF	PSPTO_4784	-	-	-	PFLU2361	-
GGDEF/EAL	PSPTO_5014	PSPPH_0499	Psyr_0509	PP_4959	PFLU5698	-
PiiZ	PSPTO_3825	PSPPH_1648	Psyr_1654	-	-	PA2960
GGDEF/EAL	PSPTO_0114	PSPPH_0079	Psyr_0074	PP_5263	PFLU5960	PA5295
GGDEF	PSPTO_0304	PSPPH_0093	Psyr_0088	PP_0216	PFLU0183	PA0290
GGDEF/EAL	PSPTO_0306	PSPPH_0091	Psyr_0086	PP_0218	PFLU0185	PA0285
GGDEF	PSPTO_0339	PSPPH_0255	Psyr_0266	PP_0129	PFLU0085	PA5487
GGDEF/EAL	PSPTO_0406	PSPPH_4801	Psyr_4770	PP_0337	PFLU0458	PA5017
GGDEF/EAL	PSPTO_0536	PSPPH_0618*	Psyr_4642	PP_0386	PFLU5593	PA0575
PiiZ	PSPTO_1241	PSPPH_1116	Psyr_1061	PP_1286	PFLU4738	PA3542
EAL	PSPTO_1483	PSPPH_1363	Psyr_1293	PP_3750	PFLU1106	PA3947
GGDEF	PSPTO_1499	PSPPH_3875	Psyr_1309	PP_1494	PFLU1225	PA3702
GGDEF/EAL	PSPTO_1737	PSPPH_3675	Psyr_3655	PP_1761	PFLU4308	PA0861
GGDEF	PSPTO_1739	PSPPH_3673	Psyr_3653	-	PFLU4306	PA3177
PiiZ	PSPTO_1923	PSPPH_3417	Psyr_3490	PP_4397	PFLU1571	PA3353
PiiZ	PSPTO_2108	PSPPH_1858	Psyr_1903	PP_2153	PFLU1582	PA2989
PiiZ	PSPTO_2116	PSPPH_1866	Psyr_1911	PP_2164	PFLU4947	PA2799
GGDEF/EAL	PSPTO_2757	PSPPH_2644	Psyr_2486	PP_3581	PFLU2753	PA1727
HD-GYP	PSPTO_1270	PSPPH_1156	Psyr_1090	PP_0979	PFLU1054	PA3832
GGDEF/EAL	PSPTO_3886	PSPPH_1586	Psyr_1598	PP_1718	PFLU2031	PA3258
GGDEF/EAL	PSPTO_4106	PSPPH_1419	Psyr_3843	PP_1144	PFLU1349	PA3311
PiiZ	PSPTO_4335	PSPPH_4037	Psyr_4027	PP_1364	PFLU5334	PA4324
GGDEF/EAL	PSPTO_4365	PSPPH_4065	Psyr_4060	PP_0914	PFLU4858	PA4367
GGDEF/EAL	PSPTO_4631	-	Psyr_4265	PP_0672	PFLU5329	PA4601
PiiZ	PSPTO_4639	PSPPH_4331	Psyr_4274	PP_4642	PFLU5960	PA4608
GGDEF	PSPTO_4837	PSPPH_4420	Psyr_4377	PP_0563	PFLU0621	PP4843

*truncada por un transposón (PSPPH_0617)

Se observa que casi todas las proteínas de Pto que portan dominios PilZ están conservadas en otras cepas del género *Pseudomonas*, con excepción de PSPTO_1027 y PSPTO_3825. PSPTO_1027 (WssB) es la subunidad catalítica de la celulosa sintasa y está presente en *P. putida*, *P. fluorescens* SBW25 y Pto, pero ausente en *P. aeruginosa*, *P. syringae* pv. *syringae* o *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Tabla 25). El dominio PilZ presente en WssB estaría implicado en la regulación alostérica de la actividad celulosa sintasa, tal y como se ha observado en otras bacterias (Ross *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 2013), por lo que su presencia se encuentra restringida a aquellos genomas que portan el operón para la síntesis de este EPS. PSPTO_3825 es una proteína con un dominio PilZ degenerado, cuyo ortólogo en *P. aeruginosa* (PA2960, PilZ) está implicado en la biogénesis de *pili* tipo IV y en la motilidad tipo *twitching*, fenotipos importantes para la adhesión y colonización en esta bacteria (Alm *et al.*, 1996). Esta proteína solo se encuentra en cepas patógenas, tanto de animales como de plantas, y ausente en aquellas *Pseudomonas* no patógenas, como *P. fluorescens* SBW25 o *P. putida* KT2440 (Tabla 25). Posiblemente existe un mecanismo conservado de adhesión y colonización regulado por c-di-GMP y esta proteína en cepas patógenas de *Pseudomonas*.

PSPTO_1923 es una de las proteínas con dominios PilZ conservada en todas las cepas analizadas. El ortólogo en otras bacterias es YcgR, una proteína que actúa como un freno molecular inhibiendo el movimiento flagelar tras unir c-di-GMP a través de su dominio PilZ (Ryjenkov *et al.*, 2006; Wolfe y Visick, 2008). Probablemente exista un mecanismo de regulación de la motilidad a nivel post-traduccional conservado en el género *Pseudomonas* mediado por la unión del c-di-GMP al dominio PilZ de los ortólogos de YcgR.

Otra proteína conservada es PSPTO_1241 (Alg44), que está presente en *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae* pvs. *syringae*, *phaseolicola* y tomato. Todas estas cepas tienen los genes necesarios para la síntesis, acetilación y secreción de este EPS, estando bastante conservados, tanto en organización génica como en secuencia (Whitney y Howell, 2013). Por tanto, la producción de alginato está bastante conservada dentro del género, así como probablemente sus mecanismos de control por c-di-GMP, tal y como se ha puesto de manifiesto en *P. aeruginosa* (Merighi *et al.*, 2007).

Existen otras proteínas de *Pseudomonas* que interactúan con el c-di-GMP presentes únicamente en bacterias fitopatógenas (*P. syringae* pvs. *syringae*, *phaseolicola* y tomato), así como varias específicas de *Pseudomonas* que interactúan con plantas, tanto beneficiosas como patógenas que, sin embargo, no están en otras bacterias del mismo género que infectan humanos y animales, como *P. aeruginosa* (Tabla 25). Esto sugiere que dichas proteínas probablemente tienen alguna función específica en los procesos de interacción, colonización y/o infección de la planta hospedadora.

Con respecto a los rizobios, el grado de desconocimiento es mayor que en *Pseudomonas*, ya que la mayoría de las proteínas descritas en este capítulo que supuestamente interactúan con c-di-GMP, son de función desconocida y/o la información disponible es muy limitada. Entre las proteínas ampliamente conservadas en distintos miembros del orden Rhizobiales, destacan la DGC SMc01370 y la proteína efectora SMc00999 (Tabla 26). El ortólogo en *C. crescentus* de SMc01370 es el regulador de respuesta PleD, implicado en regular la división celular asimétrica que genera dos células especializadas: una célula de vida libre nadadora y otra célula anclada a la superficie a través de un botón de adhesión (Aldridge *et al.*, 2003). La función de SMc01370 en rizobios no es bien conocida aunque se ha descrito que el ortólogo de PleD en *R. leguminosarum* (RL1730) está implicado en la regulación de la producción de celulosa (Ausmees *et al.*, 1999). SMc00999, una de las dos proteínas con dominios PilZ que posee Sme, se encuentra muy conservada en todos los genomas de los rizobios analizados, mientras que la otra (SMc00507) parece estar restringida al género *Sinorhizobium* (Tabla 26). Probablemente los ortólogos de SMc00999 deben regular a nivel post-traducciona una función muy conservada en los rizobios.

La proteína SM_b20523 (DGC), localizada en plásmido pSymb, y las proteínas SMA2301 (DGC) y SMA0369 (PDE), localizadas en el plásmido pSymA, son específicas de Sme. Mutantes en estos genes sugieren que dichas proteínas se encuentran implicadas en motilidad y producción de exopolisacáridos tales como la celulosa, succinoglicano o galactoglucano, componentes esenciales para la interacción planta-bacteria, aunque su implicación específica en estos procesos aún necesita ser demostrada (Wang *et al.*, 2010).

Pese a las similitudes encontradas en la organización estructural de numerosas proteínas de Pto y Sme, el estudio comparativo de estas mostró que tan solo existe una proteína que interactúa con c-di-GMP conservada en *Pseudomonas* y rizobios, estando presente en todas las cepas de *Pseudomonas* analizadas, en *S. meliloti*, *S. medicae*, *Rhizobium* NGR234, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. etli*, pero no en *M. loti*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. ORS278 o *Mesorhizobium* sp. BNC1. En Pto el gen correspondiente (PSPTO_3886) codifica una proteína que presenta dominios GGDEF y EAL en tándem, en los que el sitio catalítico y el sitio alostérico del dominio GGDEF se encuentran degenerados (I-A⁻) y el dominio EAL conservado (EAL⁺), por lo que presumiblemente posee actividad fosfodiesterasa. En los rizobios, el gen correspondiente (SMc00033 en Sme) presenta unas características funcionales similares. En secuencia, PSPTO_3886 y SMc00033 presentan un 31% de identidad y un 45% de similitud; además, sus tamaños son similares, 590 y 599 aminoácidos, respectivamente, y su organización en dominios (EAL-CBS-GGDEF) semejantes (Figura 21A). Es probable que el motivo GGDEF degenerado esté implicado en la activación alostérica de la actividad PDE, como se ha demostrado en otras bacterias (Christen *et al.*, 2005; Kuchma *et al.*, 2007), mientras que el dominio CBS está implicado en la captación de moléculas con grupos adenosil, tales como el AMP y ATP, regulando la actividad de proteínas asociadas o transportadores (Kemp, 2004).

Tabla 26. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas que interactúan con el c-di-GMP en *Sme* 1021 en comparación con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican los dominios exclusivos de la cepa *S. meliloti* 1021; en verde, los dominios presentes en el género *Sinorhizobium* (grupo Ensifer); en gris los dominios presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae y en rojo los dominios presentes en miembros de otras familias del orden Rhizobiales (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). *Sme*, *S. meliloti* 1021; *Smed*, *S. medicae* WSM419; *Sfd*, *S. fredii* NGR234; *Rle*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; *Ret*, *R. etli* CFN42; *Mlo*, *M. loti* MAFF303099; *Bja*, *B. japonicum* USDA110; *Bra*, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; *Mes*, *Mesorhizobium* sp. BNC1; *Atu*, *A. tumefaciens* C58. En el apéndice se detallan las proteínas indicadas en la tabla, pero organizadas por tipos.

	Sme 1021	Smed WSM419	Sfd NGR234	Rle 3841	Ret CFN42	Atu C58	Mlo MAFF303099	Bja USDA110
EAL	SMa0369	-	-	-	-	-	-	-
GGDEF	SMa2301	-	-	-	-	-	-	-
GGDEF	SM_b20523	-	-	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMc03141	Smed_2842	-	-	-	-	-	-
HD-GYP	SMa0392	Smed_6313	-	-	-	-	-	-
PilZ	SMc00507	Smed_1493	NGR_c15160	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMc00992	Smed_0472	NGR_c04750	-	-	-	-	-
GGDEF	SMc01464	Smed_2046	NGR_c20800	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMc03178	Smed_2805	NGR_c29670	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMa0137	Smed_5153 ²	-	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMa1548	Smed_5113 ²	NGR_b08060	-	-	-	-	-
GGDEF	SM_b20389	Smed_3728 ¹	-	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SM_b20900	-	NGR_c24200	-	-	-	-	-
EAL	SM_b21517	Smed_4347	NGR_b03430	-	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMc00033	Smed_0567	NGR_c07040	RL1275	RHE_CH01140	Atu0826	-	-
GGDEF/EAL	SMc00038	Smed_0574	-	RL1290	-	-	-	-
GGDEF/EAL	SMc03942	Smed_2761	NGR_c29150	RL4139	RHE_CH03616	-	-	-
GGDEF	SMc04015	Smed_2687	NGR_c28450	-	-	Atu3767	-	-
GGDEF/EAL	SMc00074	Smed_0533	NGR_c5400	RL1059	RHE_CH00976	Atu0784	mll7513	-
GGDEF/EAL	SMc00887	Smed_0430	NGR_c04310	RL0912	RHE_CH00850	Atu0701	mlr4740	-
PilZ	SMc00999	Smed_1043	NGR_c12500	RL2537	RHE_CH02207	Atu8163	mll0185	blr5568
GGDEF	SMc01370	Smed_0926	NGR_c10800	RL1730	RHE_CH01633	Atu1297	mll0859	bll5123
GGDEF/EAL	SM_b20447	Smed_3683 ¹	NGR_b17780	RL3088	RHE_CH02645	-	mll6708	-

¹, codificada en el plásmido pSMED01; ², codificada en el plásmido pSMED02

A pesar de haberse identificado una única proteína que interacciona con el c-di-GMP común a *Pseudomonas* y rizobios, existen otras proteínas que, aunque no presentan alta homología a nivel de secuencia, muestran cierta similitud estructural. Este es el caso de SMc01370 (PleD, 455 aminoácidos) y PSPTO_1499 (WspR, 334 aminoácidos), que presentan una organización en dominios parecida (REC-REC-GGDEF (I+A⁺) y REC-GGDEF (I+A⁺), respectivamente) (Figura 21B). Ortólogos de PSPTO_1499 están implicados en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* y en la producción de celulosa en *P. fluorescens* (Spiers *et al.*, 2002; 2003; Hickman *et al.*, 2005; Malone *et al.*, 2007; Huangyutitham *et al.*, 2013). Dada su amplia distribución entre las cepas de *Sinorhizobium* y *Pseudomonas* estudiadas y a pesar que los porcentajes de identidad y similitud entre estas dos proteínas son bajos (25% y 37%, respectivamente), probablemente actúen como reguladores de respuesta, posiblemente implicados en la producción de exopolisacáridos durante el crecimiento en superficies.

Otras proteínas que presentan similitud son PSPTO_4631 (MorA, 1278 aminoácidos) y SMa1548 (1071 aminoácidos). Al igual que en el caso anterior, estas proteínas muestran bajos porcentajes de identidad y similitud (21 y 35%), pero su hipotética actividad (I+A⁺/EAL⁺) y la organización de sus dominios es semejante: PAS-GGDEF-EAL (Figura 21C). Posiblemente, SMa1548 tenga una función similar a la descrita para MorA, relacionada con motilidad y formación de biopelículas (Choy *et al.*, 2004).

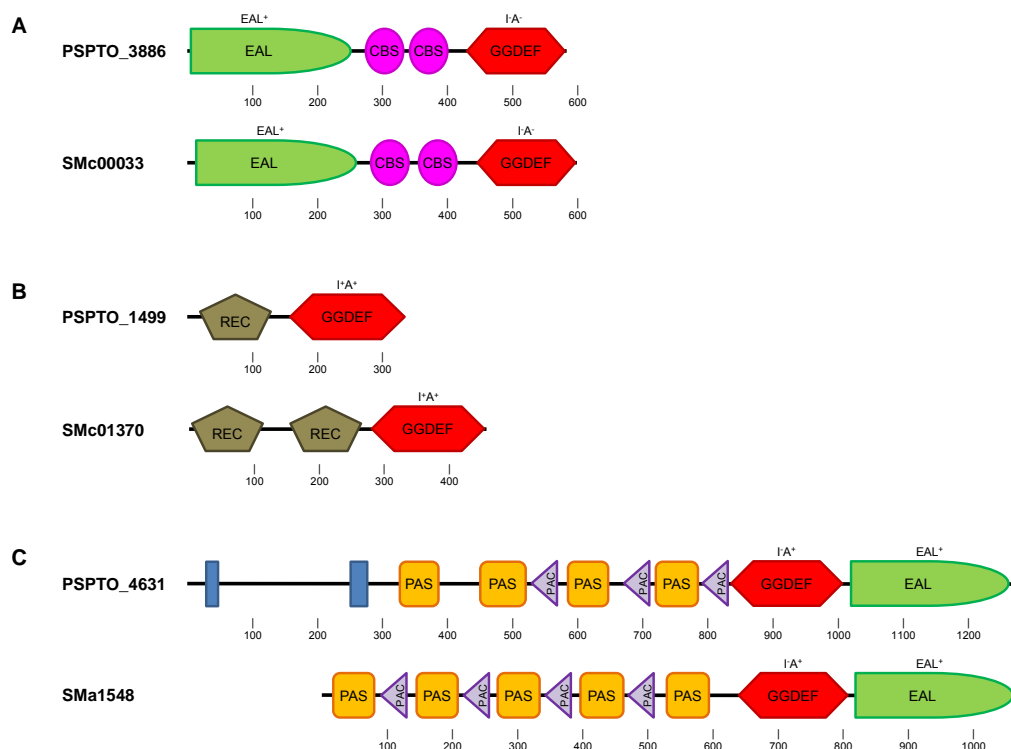


Figura 21. Análisis comparativo de las proteínas que interactúan con c-di-GMP y presentan estructuras similares en Pto y Sme.

Por otro lado, WssB (PSPTO_1027) de Pto posee ortólogos también conservados entre distintos miembros del orden Rhizobiales (como Smed_5208 en *S. medicae*, NGR_b15360 en *S. fredii*, RL1646 en *R. leguminosarum* bv. *viciae*, o Atu3309 en *A. tumefaciens*). Esta proteína está presente únicamente en aquellos genomas que contienen el operón de síntesis de la celulosa y, por tanto, ausente en *Sme*, *P. syringae* pv. *phaseolicola* o *P. aeruginosa*.

En resumen, estas homologías sugieren que, aunque *Pseudomonas* y rizobios pertenecen a grupos filogenéticamente alejados (γ y β proteobacterias, respectivamente), parecen presentar sistemas de regulación similares para funciones tan importantes para la interacción con la planta hospedadora como la motilidad, la síntesis de exopolisacáridos de diferente naturaleza y composición o la detección de superficies.

CAPÍTULO II

Importancia del segundo mensajero c-di-GMP en *P. syringae* pv. tomato

1. Incremento artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP

Tal y como se ha puesto de manifiesto en el capítulo I, el genoma de Pto codifica un alto número de proteínas que hipotéticamente interactúan con c-di-GMP, lo que sugiere la existencia de una estricta regulación de los niveles de este segundo mensajero y una alta complejidad en la transducción de señales a través del c-di-GMP en esta bacteria. Por otra parte, esta aparente redundancia génica complica su estudio mediante abordajes clásicos de mutación de las diferentes DGC y PDE. Por tanto, como una primera aproximación al estudio del papel que desempeña el c-di-GMP en Pto, decidimos provocar un incremento generalizado de los niveles intracelulares de este segundo mensajero mediante la sobreexpresión de una DGC heteróloga.

1.1. Sobreexpresión en Pto de la diguanilato ciclasa PleD* de *Caulobacter crescentus*

Para generar el incremento artificial en los niveles de c-di-GMP se recurrió a una versión mutada de la DGC PleD de *C. crescentus* (PleD*, Paul *et al.*, 2004). Así, se electroporó Pto con un plásmido portador del gen *pleD** bajo el promotor *lac* (pJBpleD*, Pérez-Mendoza *et al.*, 2014) con el fin de elevar de forma estable los niveles intracelulares de c-di-GMP.

1.2. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP

Para verificar el incremento de c-di-GMP al sobreexpresar la DGC PleD* en Pto, se cuantificaron los niveles intracelulares de este segundo mensajero mediante HPLC-MS. Para ello, se realizó la extracción alcohólica a partir cultivos bacterianos, según lo descrito por Amikam *et al.* (1995) y posteriormente se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica. A todas las muestras se le añadió c-di-GMP sintético a una concentración final conocida (250 nM) con el fin de facilitar la detección en condiciones basales, es decir, en ausencia del gen *pleD** (apartados 8.1 y 8.2 de Materiales y Métodos). De esta manera se analizaron los niveles intracelulares de c-di-GMP en Pto sobreexpresando el gen *pleD** [Pto (pJBpleD*)] y de su cepa control [Pto (pJB3Tc19)], observándose que PleD* provoca un aumento de hasta 18 veces en los niveles intracelulares de c-di-GMP con respecto al control (Figura 22). Una vez corroborado el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de *pleD**, decidimos estudiar su efecto en el estilo de vida de Pto, tanto en vida libre como en la interacción con su planta hospedadora.

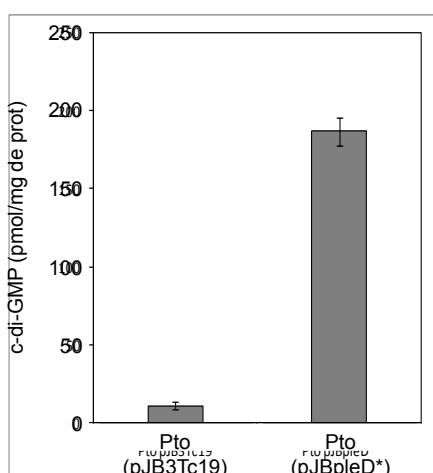


Figura 22. Cuantificación de los niveles de c-di-GMP mediante HPLC-MS. Se expresan las cantidades de c-di-GMP en picomoles por mg de proteína total en Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*). Las barras indican el error típico de al menos tres réplicas biológicas.

2. Efecto de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en el estilo de vida libre de Pto

El c-di-GMP es un segundo mensajero encargado de traducir distintos estímulos ambientales y/o celulares en respuestas fisiológicas adaptativas, entre las que se encuentra la transición de un estilo de vida mótil a uno sésil, afectando a una gran variedad de procesos celulares en muchas bacterias (Römling *et al.*, 2013). Sin embargo, la acción de este segundo mensajero en otras cepas, como las *Pseudomonas* pertenecientes al grupo *syringae*, es completamente desconocida. Por esta razón, decidimos estudiar el efecto de altos niveles de c-di-GMP sobre fenotipos de Pto tales como la motilidad bacteriana tipo *swimming* y *swarming*, la morfología de colonias, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelículas y la secreción de proteínas.

2.1. Efecto del c-di-GMP en motilidad

La motilidad bacteriana es un factor de virulencia muy importante, ya que permite a la bacteria dirigirse hacia entornos favorables o escapar de condiciones adversas, incrementando su competitividad en el medio ambiente. A su vez, está implicada en varios procesos como las respuestas tácticas (quimiotaxis, aerotaxis, etc.), la colonización del hospedador, la formación de biopelículas, el desarrollo bacteriano y su dispersión (Turnbull *et al.*, 2001; Wadhams *et al.*, 2004). El flagelo es uno de los orgánulos de locomoción más complejos y efectivos, capaz de propulsar a las bacterias en medios líquidos (motilidad tipo *swimming*) y sobre superficies o a través de ambientes viscosos (motilidad tipo *swarming*). Además, los flagelos son cruciales en la transición de un estilo de vida mótil a uno sésil asociado con la expresión de factores de virulencia, por lo que su producción requiere una alta velocidad de respuesta y está sometida a un estricto control. El c-di-GMP interviene en estos procesos en diversas bacterias regulándolos, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Wolfe y Visick, 2008).

De forma similar a lo observado en otras bacterias (Simm *et al.*, 2004; Wolfe *et al.*, 2008; Boehm *et al.*, 2010; Fang y Gomelsky, 2010), un incremento de los niveles de c-di-GMP en Pto provocó una disminución acusada de la motilidad, tanto *swimming* como *swarming* (Figura 23). Estudios de transcriptómica realizados en nuestro laboratorio muestran que el incremento de los niveles de c-di-GMP provoca una disminución en la expresión del gen *fliC*, que codifica la flagelina, componente mayoritario del flagelo bacteriano (Figura 24). Estos resultados apuntan a que altos niveles de c-di-GMP tienen un impacto negativo sobre la motilidad de Pto, probablemente ejerciendo su efecto a nivel transcripcional. Sin embargo, no podemos descartar un control adicional a nivel post-traducciona a través del ortólogo de la proteína YcgR (PSPTO_1923). Dicha proteína en enterobacterias actúa como un "freno molecular" mediante la unión del c-di-GMP a su dominio PilZ, lo que promueve su interacción con MotA y MotB del cuerpo basal del flagelo, frenando la rotación del mismo, con la consiguiente disminución de la motilidad (Ryjenkov *et al.*, 2006; Fang y Gomelsky, 2010). Asimismo, el incremento de los niveles de c-di-GMP en Pto induce la producción de exopolisacáridos como celulosa (ver más abajo, apartado 2.2) y se ha demostrado que la acumulación de estos compuestos puede impedir el funcionamiento del flagelo y, por tanto, la motilidad bacteriana (Zorraquino *et al.*, 2012).

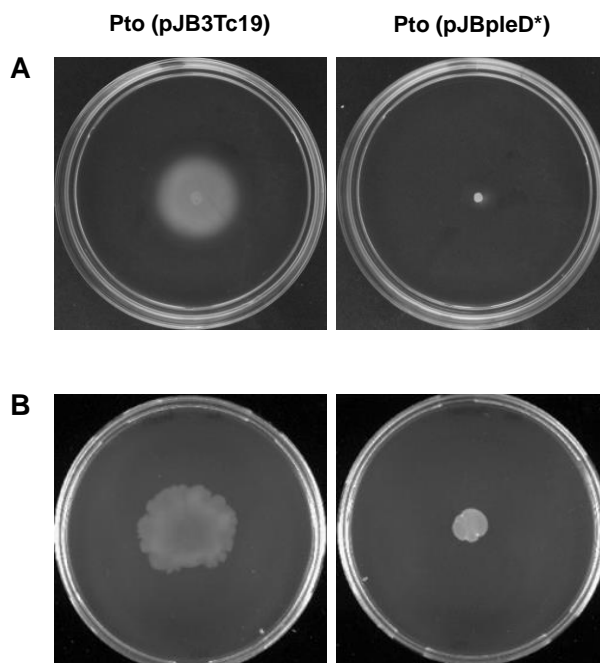


Figura 23. Motilidad de Pto en presencia y ausencia de altos niveles intracelulares de c-di-GMP. En la figura se muestra una foto representativa de la motilidad tipo *swimming* (A) y *swarming* (B) de la cepa silvestre de Pto en ausencia (pJB3Tc19) y en presencia del gen *pleD** (pJBpleD*). 2 μ l de una suspensión bacteriana ajustada a una $DO_{660}=2,0$ se pincharon en el centro de placas de LB (0,3% agar) para los ensayos de *swimming* (A) o se depositaron en la superficie de placas de PG-agar (0,5% agar) para los ensayos de *swarming* (B). Las placas se incubaron durante 48 h a 25°C.

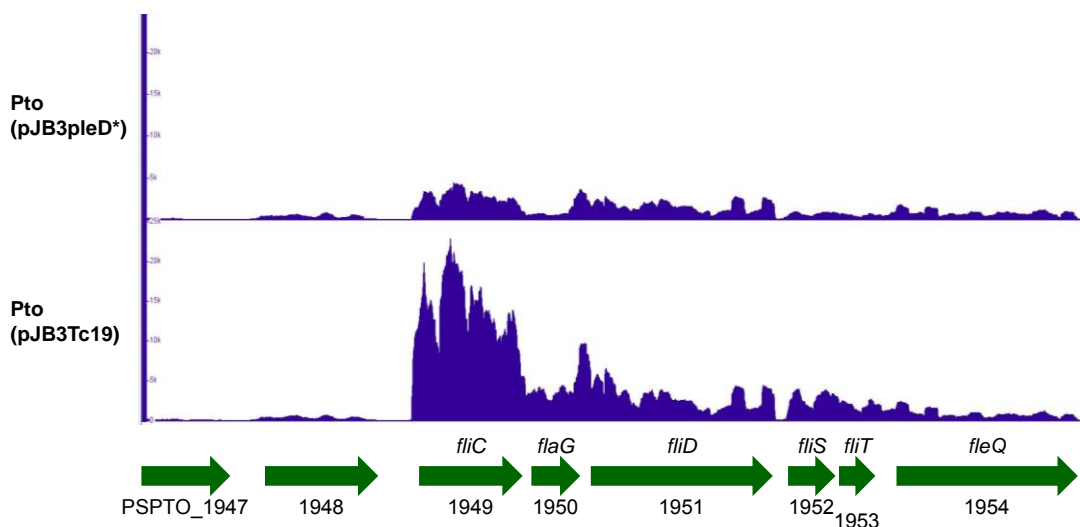


Figura 24. Niveles de ARNm de *fliC* y genes adyacentes. Las cepas Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJB3pleD*) se cultivaron en MMR con Tc (10 μ g/ml) a 20°C hasta una DO_{660} de 1, momento en que se realizó la extracción del ARN según lo descrito en Materiales y Métodos (apartado 4.1). Los niveles de transcrito se obtuvieron tras secuenciación masiva del cDNA total (IlluminaHiSeq 2000, Macrogen) y procesamiento de las lecturas. En la gráfica se muestra la cobertura (número de lecturas) de la región de *fliC* en las dos librerías de cDNA sometidas a RNA-seq visualizadas con IGB.

2.2. Efecto del c-di-GMP en la morfología de las colonias y en la producción de exopolisacáridos

La producción y acumulación de exopolisacáridos son esenciales para la adhesión de la bacteria a su hospedador y, por tanto, cruciales en las etapas iniciales de la interacción bacteria-planta. Ambos procesos se encuentran regulados por c-di-GMP en diversas especies bacterianas, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, observándose que el incremento en la producción de compuestos extracelulares dependiente de altos niveles de c-di-GMP modifica el aspecto de las colonias y, más concretamente su forma, tamaño, brillo y mucosidad (Lee *et al.*, 2007; Tagliabue *et al.*, 2010; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; Mann y Wozniak, 2012; Steiner *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *Salmonella* el incremento de los niveles intracelulares de c-di-GMP genera un fenotipo de colonia denominado *rdar* (del inglés *red, dry and rough*) debido a la producción de polisacáridos de cápsula, celulosa y fimbrias (Römling, 2005; Kader *et al.*, 2006). En *P. aeruginosa*, se conoce como *WS* (*wrinkly spreader*) o *RSCV* (*rugose small-colony variants*) y está asociado a la síntesis de alginato y exopolisacáridos ricos en glucosa y manosa (Friedman y Kolter, 2004; Römling, 2005; Starkey *et al.*, 2009). En *P. fluorescens* SBW25 este fenotipo es consecuencia de un incremento en la producción de celulosa mediado por la actividad DGC de WspR (Spiers *et al.*, 2003; Goymer *et al.*, 2006; Malone *et al.*, 2007).

El incremento en los niveles de c-di-GMP en Pto tuvo un claro impacto en la morfología y color de las colonias crecidas en placas con CR y CF, resultando similar al fenotipo *rdar* de *Salmonella* o *WS* de *Pseudomonas* (Figura 25). Concretamente en CR, la sobreexpresión de *pleD** en Pto generó colonias rojas y rugosas, a diferencia de la cepa control que formaba colonias ligeramente rosadas y mucosas. Por su parte, en CF las colonias de Pto (*pJBpleD**), a diferencia de la cepa control, emitían una mayor fluorescencia bajo luz UV.

Este fenotipo CR⁺ y CF⁺ sugiere que Pto (*pJBpleD**) produce celulosa en respuesta a niveles elevados de c-di-GMP. En este sentido, Pto posee los genes necesarios para la síntesis de celulosa (*wssABCDEFGHI*; Buell *et al.*, 2003; Whitney y Howell, 2013). En otras bacterias portadoras de dicho operón se ha demostrado que la producción de celulosa está controlada a nivel post-traducciona l de forma alostérica por el c-di-GMP, ya que su unión al dominio PilZ de la celulosa sintasa induce la actividad de la enzima y la síntesis de este biopolímero (Benziman *et al.*, 1980; Ross *et al.*, 1987; Amikam y Benziman, 1989; Ross *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 2013).

Para comprobar este punto, decidimos construir un mutante dirigido en el operón *wss* de Pto generando una deleción de 2.642 pb, desde la segunda mitad del gen *wssB* (PSPTO_1027, que codifica la subunidad catalítica de la celulosa sintasa) hasta la primera mitad del gen *wssC* (PSPTO_1028). Este mutante se denominó Pto Δ *wssBC* (ver apartado 1.2.2 de Material y Métodos). A esta cepa se le incorporó por electroporación el plásmido *pJBpleD** para, a continuación, estudiar su fenotipo en placas con CR en comparación con la cepa silvestre. La cepa Pto Δ *wssBC* (*pJBpleD**) mostró un fenotipo CR⁻, confirmando que dicho operón es indispensable para el fenotipo CR⁺ inducido por altos niveles de c-di-GMP en Pto (Figura 26).

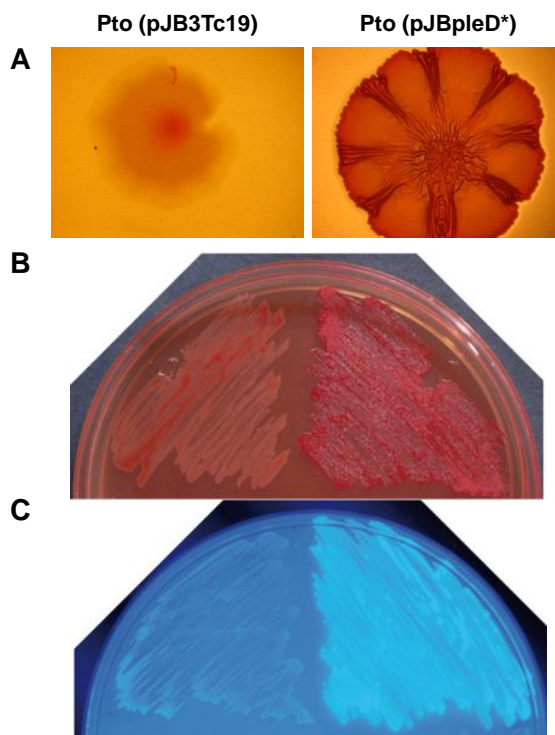


Figura 25. Apariencia de las colonias de Pto en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Morfología de colonia (A) y crecimiento en masa en presencia de CR (B) y CF (C) de Pto expresando *pleD** comparado con la cepa control con el plásmido vacío. Las cepas se crecieron durante 2 días a 20°C en placas de medio mínimo MMR suplementadas con tetraciclina (10 µg/ml) y CR (50 µg/ml, A y B) o CF (200 µg/ml, C). Las fotos de las placas de CF se obtuvieron bajo luz UV.

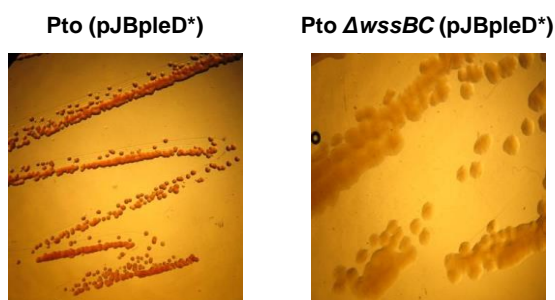


Figura 26. Fenotipo en CR de las cepas Pto y el mutante Pto $\Delta wssBC$ en presencia de altos niveles intracelulares de c-di-GMP (*pJBpleD).** Las cepas se crecieron durante 2 días a 20°C en placas de LB suplementadas con tetraciclina (10 µg/ml) y CR (50 µg/ml).

El fenotipo CF⁺ puede ser cuantificado en el fluorímetro midiendo la fluorescencia generada por cultivos líquidos suplementados con CF (ver apartado 7.1.2. de Material y Métodos). La fluorescencia emitida por la cepa silvestre sobreexpresando *pleD** fue más de 10 veces superior a la de la cepa silvestre con el plásmido vacío (Figura 27); sin embargo, la fluorescencia emitida por el mutante Pto $\Delta wssBC$ no incrementó significativamente en presencia de *PleD**, mostrando unos niveles incluso inferiores a los

observados con la cepa parental en ausencia de PleD* (pJB3Tc19; Figura 27), sugiriendo que existe una producción basal de celulosa en la cepa parental en ausencia de PleD*, la cual debe funcionar con el c-di-GMP endógeno, explicando la diferencia entre la cepa parental y el mutante Pto $\Delta wssBC$. Estos resultados confirman que la celulosa es el compuesto inducido por c-di-GMP responsable del fenotipo CF⁺ en Pto.

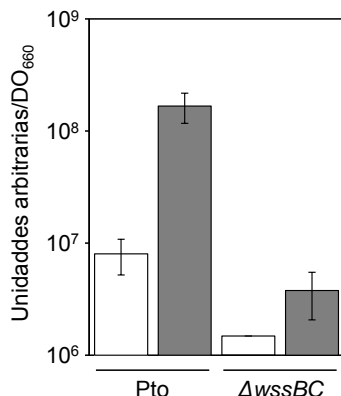


Figura 27. Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos bacterianos de Pto y Pto $\Delta wssBC$ en presencia y ausencia de altos niveles de c-di-GMP. Pto y Pto $\Delta wssBC$ con pJB3Tc19 (blanco) o pJBpleD* (gris) se cultivaron en MMR con CF (100 μ M) durante 24 h a 20°C para posteriormente medir la emisión de fluorescencia del CF unido a las diferentes cepas (ver apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se expresa la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por unidad de absorbancia del cultivo a 660 nm (DO₆₆₀). Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas de al menos 3 muestras independientes.

Se debe mencionar que la producción de celulosa es dependiente de medio y de temperatura siendo máxima en el medio mínimo MMR, tanto en líquido como en placa, y a 20°C, y menor en el medio rico LB y/o a 28°C.

2.3. Efecto del c-di-GMP en la formación de biopelículas

Las biopelículas son agregados bacterianos que funcionan como un consorcio cooperativo ayudando a la colonización de superficies sólidas y proporcionando protección frente a distintos estreses ambientales (Donlan *et al.*, 2002; Ramey *et al.*, 2004). En la biopelícula madura las células están encerradas en una matriz extracelular compuesta de diversos biopolímeros como proteínas, exopolisacáridos y ADN extracelular. Dicha matriz proporciona estabilidad mecánica a la biopelícula, facilita la adhesión a la superficie de toda la comunidad celular y favorece la captación de nutrientes y de otras moléculas biológicamente activas, como las señales de comunicación célula-célula. Además, esta matriz funciona como un escudo protegiendo a la comunidad bacteriana frente a predadores, como protozoos y fagos líticos, la desecación, los rayos UV, distintos agentes antimicrobianos e, incluso, la respuesta inmune de hospedadores eucariotas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Flemming y Wingender, 2010). De forma más específica, la formación de agregados o microcolonias en las hojas de sus hospedadores permite a las bacterias adaptarse a su entorno, mejorando sus posibilidades de supervivencia en la filosfera (Monier y Lindow, 2004).

El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediante la sobreexpresión de *pleD**, provocó un aumento en la formación de biopelículas de Pto en la interfase líquido-aire, tanto en tubos de borosilicato como en placas multipocillo de poliestireno (Figura 28 y datos no mostrados). Estas biopelículas precipitaban fácilmente, lo que sugiere una fuerte adhesión entre las células pero una unión débil a las superficies abióticas ensayadas (Robertson *et al.*, 2012). Otras cepas de *Pseudomonas* aisladas del ambiente también forman este tipo de biopelículas en la interfase líquido-aire y en ellas se ha identificado la celulosa como el componente principal de la matriz extracelular (Spiers *et al.*, 2003; Ude *et al.*, 2006).

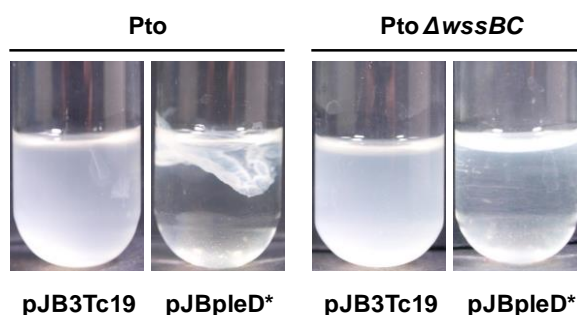


Figura 28. Formación de biopelículas de Pto y Pto $\Delta wssBC$ en la interfase líquido-aire en ausencia y presencia de PleD*. Pto y Pto $\Delta wssBC$ con pJB3Tc19 o pJBpleD* se cultivaron en MMR con Tc (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 h a 20°C en tubos de borosilicato en condiciones estáticas.

Curiosamente, el mutante Pto $\Delta wssBC$ en presencia de altos niveles intracelulares de c-di-GMP (pJB3pleD*) también fue capaz de formar biopelículas en la interfase líquido-aire aunque con una consistencia diferente, lo que implica que la celulosa puede ser un componente de la matriz, pero no es absolutamente necesaria para la formación este tipo de biopelículas. En consonancia con esto, otras cepas de *Pseudomonas* que carecen del operón de síntesis de celulosa también forman este tipo de biopelículas, indicando que el incremento en los niveles de este segundo mensajero podría provocar la producción de otros EPSs en Pto, como alginato, levanos, Pel o Psl (Friedman y Kolter, 2004; Laue *et al.*, 2006; Ude *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Starkey *et al.*, 2009; Mann y Wozniak, 2012; Whitney y Howell, 2013).

2.4. Efecto del c-di-GMP en el secretoma

La secreción de macromoléculas en bacterias Gram-negativas ocurre mediante una gran variedad de sistemas de secreción, algunos sencillos y otros altamente complejos, que han sido clasificados en seis grandes grupos y denominados tipo I-VI (Koster *et al.*, 2000). Concretamente, en bacterias fitopatógenas, las macromoléculas secretadas mediante estos sistemas son cruciales para el desarrollo de la enfermedad, ya que están implicadas en multitud de procesos como la adhesión a la planta, la degradación de las paredes celulares, la liberación de factores de virulencia en el citoplasma de las células vegetales o la supresión de las respuestas de defensa (Jin *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2010; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011a). El c-di-GMP se ha revelado recientemente como una molécula clave en la regulación de la

expresión de varios sistemas de secreción bacterianos; es más, los niveles de este segundo mensajero podrían regular diferencialmente distintos sistemas en una misma bacteria para controlar la transición entre dos tipos de infección. Así, en *P. aeruginosa*, el incremento de los niveles de c-di-GMP inhibe la expresión del T3SS y activa la expresión del T6SS, regulando positivamente la transición de un estado de infección agudo a otro crónico (Moscoso *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, es plausible pensar que el c-di-GMP tenga un papel relevante en la interacción de Pto con la planta a través de la regulación de sus sistemas de secreción. Para estudiar este aspecto, se compararon los secretomas de la cepa silvestre con el plásmido vacío (pJB3Tc19) y con *pleD** (pJB3pleD*) usando geles bidimensionales, con el fin de identificar las proteínas de la fracción extracelular cuya abundancia se ve alterada al incrementar los niveles de c-di-GMP (Figura 29).

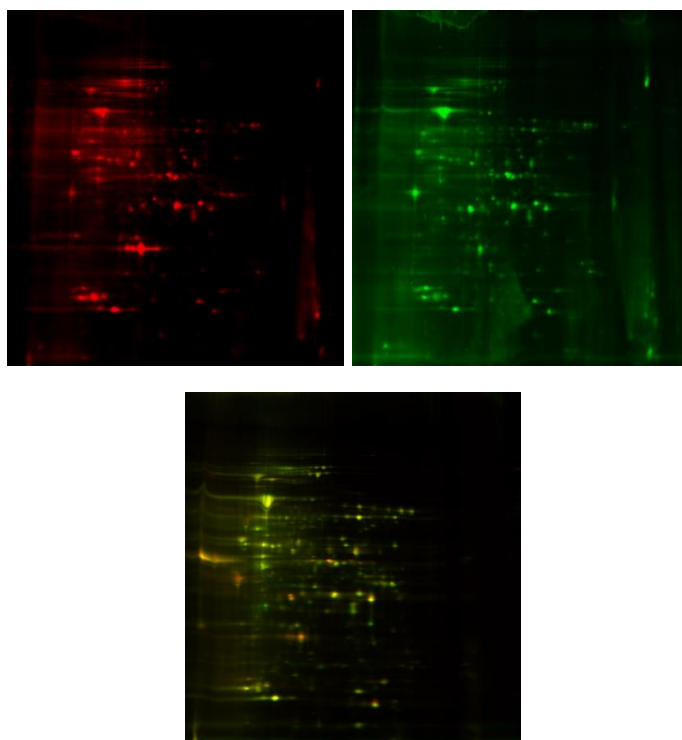


Figura 29. Geles bidimensionales del secretoma de Pto en presencia y ausencia de PleD*. Proteínas secretadas por las cepas Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJB3pleD*) preparadas según lo indicado en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos y diferencialmente marcadas. Las muestras se separaron mediante electroforesis en geles bidimensionales (SDS-PAGE cubriendo un rango de pH de 3 a 10). En el gel de la izquierda se observa el secretoma de Pto (pJB3Tc19) marcado con Cy3 (rojo) y en el gel de la derecha se observa el estándar interno (mezcla del secretoma de ambas condiciones, con pJB3Tc19 y pJB3pleD*) marcado con el fluoróforo Cy5 (verde). El gel de la parte inferior de la figura corresponde al solapamiento de la imagen de los dos fluoróforos.

La sobreexpresión de *pleD** en Pto provocó un incremento significativo en los niveles de tan solo 4 proteínas, todas ellas de hipotética localización periplásmica (PSPTO_1134, PSPTO_1479, PSPTO_2996 y PSPTO_4350), indicando que los altos niveles de c-di-GMP no parecen tener un amplio impacto sobre el secretoma de Pto. Hay que tener en cuenta que Pto presenta unos niveles de secreción proteica muy inferiores a los de otros fitopatógenos. Por ejemplo, *Pectobacterium atrosepticum* secreta una gran batería

de enzimas extracelulares claves en el proceso de patogénesis (Coulthurst *et al.*, 2006). El principal factor de virulencia de Pto es el T3SS, que moviliza los efectores directamente al citoplasma de la célula vegetal (Jin *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2006); sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la abundancia de ninguna de las proteínas del T3SS ni de sus efectores en el secretoma de Pto. Respecto a esto, se debe señalar que los ensayos se llevaron a cabo en LB, es decir, en condiciones no inductoras del T3SS, ya que este sistema solo se expresa en presencia de la planta o, en su defecto, en un medio de cultivo inductor específico, como el MMF (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992). Por último, no hay que olvidar que este segundo mensajero ejerce su acción fundamentalmente a nivel post-traduccional, regulando alostéricamente la actividad de numerosas enzimas bacterianas (Schirmer y Jenal, 2009). Por tanto, es posible que en Pto el c-di-GMP actúe regulando preferentemente la actividad de determinadas proteínas pero no su cantidad.

Otro hecho digno de mención es que ninguna de las proteínas identificadas en el secretoma de Pto en condiciones de altos niveles de c-di-GMP está anotada como proteína de localización extracelular, sino que todas ellas son hipotéticas proteínas periplásmicas. Este tipo de proteínas ya se han identificado en la fracción secretada de otras bacterias que interactúan con plantas como *Erwinia chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* o *R. etli* (Kazemi-Pour *et al.*, 2004; Coulthurst *et al.*, 2008; Meneses *et al.*, 2010) y su presencia en el secretoma podría deberse a la contaminación de la fracción extracelular por lisis celular durante el procesamiento de las muestras. Otra posibilidad es que muchas de las proteínas identificadas se encuentren mal anotadas y sean realmente proteínas extracelulares o asociadas de forma laxa a la membrana externa (Meneses *et al.*, 2010).

PSPTO_4350 es una proteína hipotética de función desconocida que tiene un dominio conservado de tipo Ycel. Los miembros de la familia Ycel son proteínas periplásmicas que se expresan en condiciones de pH básico y están implicadas en la unión a lípidos poli-isoprenoides (Handa *et al.*, 2005).

PSPTO_1134 y PSPTO_2996 son proteínas que forman parte de sistemas transportadores de tipo ABC aún no caracterizados en Pto. Estos transportadores están implicados en diferentes procesos biológicos en otras bacterias, como la captación de nutrientes (p. ej. aminoácidos) y la secreción de diversas moléculas (EPS, compuestos antimicrobianos, etc.), gracias a la hidrólisis de ATP (Cuthbertson *et al.*, 2010).

PSPTO_1479, anotada como DsbC, es una isomerasa de localización periplásmica cuya función es la formación de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas en el espacio periplásmico bacteriano. El sitio catalítico de la enzima está compuesto de dos cisteínas separadas por dos residuos (CXXC) y se encuentra conservado en diferentes bacterias fitopatógenas (Figura 30). La formación de puentes disulfuro es un proceso crítico para el plegamiento correcto de proteínas ricas en residuos de cisteína y, por tanto, para su función. DsbC posee también actividad chaperona dependiente de estrés oxidativo (Heras *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012). Concretamente, DsbC juega un papel muy importante en bacterias fitopatógenas asegurando el correcto plegamiento de gran cantidad de proteínas secretadas, factores de virulencia y componentes de superficie, como adhesinas, y se expresa diferencialmente cuando las bacterias se encuentran en asociación con su hospedador (Santos *et al.*, 2012).

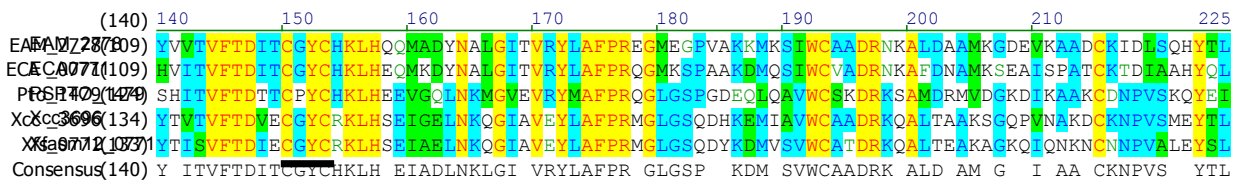


Figura 30. Alineamiento del dominio catalítico de proteínas DsbC presentes en diferentes bacterias fitopatógenas. El dominio CXXC está indicado con una línea negra. A la izquierda se indica el nombre de cada una de las ORFs: EAM, *Erwinia amylovora* ATCC 49946; ECA, *Pectobacterium atrosepticum*; PSPTO, *P. syringae* pv. tomato DC3000; Xcc, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y Xfasm12, *Xylella fastidiosa* M12. Las letras rojas con fondo amarillo indican residuos idénticos, las letras azules con fondo azul indican residuos conservados, las letras negras con fondo verde indican residuos poco conservados y las letras negras con fondo blanco indican residuos no conservados.

Proteínas chaperonas como DsbC juegan además un papel importante en el procesamiento de proteínas secretadas por otros sistemas de secreción, como el T2SS y T3SS. En el patógeno vegetal *E. chrysanthemi* el sistema Dsb determina la secreción por el T2SS de celulasas y pectatoliasas que degradan los tejidos vegetales (Bortoli-German *et al.*, 1994; Lagaert *et al.*, 2009). Por su parte, algunos de los efectores secretados por los T3SS requieren chaperonas de este tipo para mantener las proteínas desplegadas, evitar su agregación o proteólisis en el espacio periplásmico, o bien, funcionan como señales de secreción dirigiendo el efector al T3SS (Losada y Hutcheson, 2005).

Hasta el momento, no se ha descrito ningún vínculo entre el sistema Dsb y el c-di-GMP en ninguna bacteria; sin embargo, el incremento de los niveles de DsbC en el secretoma de Pto en respuesta a elevados niveles intracelulares de c-di-GMP, sugiere la implicación de este segundo mensajero en la regulación de la secreción de proteínas procesadas por el sistema Dsb en el periplasma, haciendo de esta una proteína un elemento muy interesante para estudios futuros. Además, es probable que el estrés oxidativo con el que la planta somete al patógeno induzca alguna respuesta bacteriana mediada por DsbC (Santos *et al.*, 2012). Dicha respuesta podría estar también condicionada por los altos niveles intracelulares de c-di-GMP supuestamente presentes durante el proceso infeccioso.

3. Efecto de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en la interacción de Pto con su planta hospedadora

Tal y como se ha indicado anteriormente, el sistema de T3SS de Pto constituye el principal factor de virulencia en huéspedes susceptibles, como el tomate o *A. thaliana*, e induce la respuesta hipersensible en plantas resistentes (Alfano y Collmer, 1997). Con objeto de estudiar el efecto de los altos niveles de c-di-GMP sobre la expresión del T3SS en Pto, se cultivaron las cepas Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*) en condiciones inductoras del T3SS, es decir, en medio MMF y se analizó mediante qRT-PCR la expresión del factor sigma alternativo *hrpL*, necesario para la transcripción de numerosos genes y efectores del T3SS, y de uno de los genes estructurales, *hrpA*, que codifica la pilina de dicho sistema de secreción.

El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP tuvo un ligero efecto negativo a nivel transcripcional en los genes *hrpL* y *hrpA* (Figura 31). Resultados similares se han observado en *P. aeruginosa*, en donde el incremento en los niveles de c-di-GMP tiene un efecto negativo en la expresión del T3SS mientras que activa la expresión del T6SS, regulando de esta manera positivamente la transición entre un estado de infección agudo a uno crónico (Moscoso *et al.*, 2011).

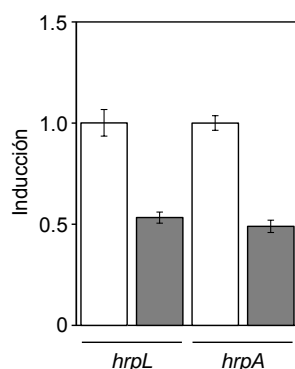


Figura 31. Efecto de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en los niveles de expresión de los genes *hrpL* y *hrpA*. El ARN total se extrajo de las cepas Pto (pJB3Tc19, blanco) y Pto (pJB3pleD*, gris) tras crecerlas en LB hasta una DO₆₆₀ de 0,5 y posteriormente en MMF durante 3 h a 20°C. Los valores de expresión se normalizaron con la expresión de *gyrA* y están referidos para cada uno de los genes a la cepa silvestre sin PleD*. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas.

Sin embargo, el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP no tuvo un impacto significativo sobre la virulencia de Pto en tomate bajo las condiciones ensayadas, ya que ambas cepas, Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*), provocaron síntomas similares y consistentes con el tipo de lesión generada por la cepa silvestre (Preston, 2000): en primer lugar, aparecieron unas pequeñas lesiones acuosas que a los 2-3 dpi se rodearon de un halo de clorosis para posteriormente necrosarse (Figura 32).



Figura 32. Desarrollo de síntomas provocados por Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*) en hojas de tomate.

A. Desarrollo de síntomas inducidos en folíolos de hojas de tomate 9 dpi por infiltración con soluciones bacterianas a 10^6 ufc/ml.

B. Desarrollo de síntomas inducidos en hojas de tomate 12 dpi por rociado con soluciones bacterianas a 10^8 ufc/ml.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indicaron que el plásmido pJBpleD* no parece ser estable en ausencia de la presión selectiva del antibiótico en bacterias simbióticas de plantas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Con el propósito de comprobar si la ausencia de diferencias entre las cepas Pto (pJB3Tc19) y Pto (pJBpleD*) se debía a la pérdida de los plásmidos, se analizó la estabilidad en planta de ambas construcciones. Sin embargo, tanto pJB3Tc19 como pJBpleD* se mantuvieron estables en la población a lo largo de las diferentes etapas de la infección (Figura 33). Por tanto, la ausencia de diferencias en la sintomatología causada por estas dos cepas no se debía a la pérdida del plásmido, lo que sugiere que un aumento artificial generalizado de los niveles de c-di-GMP no tiene un impacto notorio en la virulencia de Pto, al menos en las condiciones ensayadas.

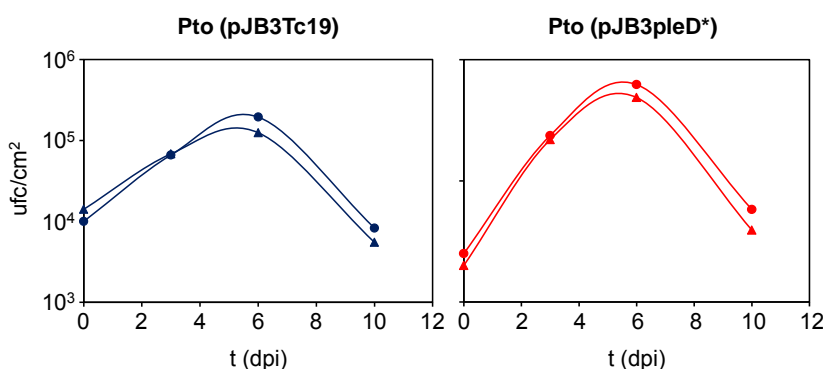


Figura 33. Estabilidad de los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD* en Pto durante la infección en plantas de tomate. Seguimiento del crecimiento en planta a lo largo del tiempo (0, 3, 6, y 10 dpi) de las cepas Pto (pJB3Tc19, azul) y Pto (pJBpleD*, rojo) en hojas de tomate tras pulverizarlas con una solución bacteriana con aproximadamente 10⁶ ufc/ml. Se determinó el número de ufc/cm² en hojas de plantas de tomate tras conteo en placas de LB con Tc (10 µg/ml) para las células que tienen el plásmido (triángulos) y sin Tc para la población total (círculos). Los datos representan el promedio de cuatro experimentos diferentes.

Experimentos similares realizados en nuestro laboratorio con otras bacterias que interactúan con plantas sugieren que el c-di-GMP juega un papel importante en la interacción con el hospedador; sin embargo, un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP parece afectar de forma diferente dependiendo del estadio y del tipo específico de interacción microbio-planta (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Así, en *R. leguminosarum* la sobreexpresión de PleD* provoca un aumento en la adhesión y colonización de las raíces de judía, aunque esto no se traduce en una mayor eficiencia simbiótica, sino todo lo contrario, supone un perjuicio para el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Resultados similares se obtuvieron con *P. savastanoi*: las cepas que sobreexpresan PleD* generan tumores mucho más grandes que los formados por la cepa control, pero menos necrosados. Estas observaciones apuntan a que los altos niveles de c-di-GMP parecen potenciar los estadios iniciales de la interacción con el hospedador, pero perjudican otros posteriores (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).

Tal y como se ha mostrado en este capítulo, el incremento de los niveles de este segundo mensajero en Pto afecta drásticamente a diferentes fenotipos asociados a la vida libre de esta bacteria, como motilidad, producción de EPS, agregación y formación de biopelículas. Dichos fenotipos han demostrado ser importantes en las etapas iniciales de la interacción de diferentes bacterias con su hospedador (Ramey *et al.*, 2004; Danhorn y Fuqua, 2007; Morris y González, 2009). Por ejemplo, la motilidad tipo *swimming* y *swarming* es esencial en diferentes bacterias durante el proceso de colonización e invasión (Smith y Hoover, 2009; Matilla *et al.*, 2011). Así, en *P. syringae* pv. *tabaci* mutantes afectados en motilidad tipo *swimming* son también menos virulentos (Ichinose *et al.*, 2003). Sin embargo, la reducción en motilidad por el aumento generalizado de los niveles intracelulares de c-di-GMP en Pto no alteró significativamente su interacción con su hospedador ni su virulencia, al menos en las condiciones ensayadas.

En varias bacterias patógenas, tanto de animales como de plantas, se ha demostrado que el incremento de c-di-GMP tiene un impacto negativo en virulencia a través de la supresión del T3SS (Yi *et al.*, 2010; Moscoso *et al.*, 2011). Por ejemplo, en *Dickeya dadantii* la disminución de los niveles de c-di-GMP mediada por proteínas con actividad PDE, induce la expresión de T2SS y T3SS, principales factores de virulencia en esta bacteria (Yi *et al.*, 2010). En el patógeno humano *P. aeruginosa* el aumento de los niveles de c-di-GMP reprime la expresión del T3SS, impidiendo el avance a un estado de infección agudo (Moscoso *et al.*, 2011). Sin embargo, en Pto, a pesar de que el incremento de los niveles de este segundo mensajero tiene un ligero efecto negativo en la expresión del T3SS, no resultó suficiente para provocar una disminución en virulencia en las condiciones ensayadas. En ese sentido, la sobreexpresión de *pleD** provocó un aumento artificial generalizado de los niveles intracelulares de c-di-GMP en Pto, lo que tiene consecuencias notorias sobre varios fenotipos de vida libre, pero es probable que este efecto generalizado resulte compensatorio cuando Pto se encuentra en la planta, pudiendo, en última instancia no verse así afectada su virulencia. De cualquier manera, los resultados obtenidos en Pto, junto con estudios realizados en otras bacterias que interaccionan con plantas, sugieren que existe una estricta regulación de los niveles de este segundo mensajero con objeto de coordinar los diferentes procesos bacterianos necesarios para que la interacción con la planta hospedadora sea fructífera.

CAPÍTULO III

Identificación y caracterización de genes de *P. syringae* pv. tomato relacionados con el c-di-GMP e implicados en la interacción con la planta

1. Mutagénesis al azar de Pto con Tn5

En el capítulo II se ha puesto de manifiesto que el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP mediados por la sobreexpresión de *PleD** provoca un aumento en la producción de compuestos extracelulares generando un fenotipo de colonia CR⁺, similar a los fenotipos *rdar*, *WS* o *RSCV* descritos en *Salmonella* y *P. aeruginosa* (Friedman y Kolter, 2004; Römling, 2005; Starkey *et al.*, 2009). Con el objetivo de identificar los genes responsables del fenotipo CR⁺ se llevó a cabo una mutagénesis generalizada en Pto con el transposón Tn5.

1.1. Obtención de los mutantes

La mutagénesis se llevó a cabo utilizando un transposón Tn5 localizado en un vector suicida movilizable (pSUP2021). Como cepa donadora se empleó *E. coli* β 2163 (pSUP2021) y como cepas receptoras se utilizaron, tanto la cepa Pto DC3000 silvestre como el correspondiente mutante *fliC*. Se recurrió a este mutante carente de flagelos para evitar que los transconjugantes se dispersaran en la placa mediante movimiento *swarming*, como ocurre con la cepa silvestre, y facilitar así su selección. Mediante este procedimiento se obtuvieron más de 6.000 transposantes Km^R, tanto en Pto como en Pto *fliC*.

A continuación, se introdujo por conjugación el plásmido pJBpleD* a los transposantes en masa y a las cepas parentales Pto y Pto *fliC* como control, con el fin de identificar colonias que estuvieran afectadas el fenotipo CR con respecto a las respectivas cepas control. Se observaron resultados similares en ambos fondos genéticos (Pto y Pto *fliC*): la gran mayoría de las colonias eran lisas y rojas (CR⁺), similares a las producidas por las cepas parentales en presencia de *pleD** [Pto (pJBpleD*) y Pto *fliC* (pJBpleD*)]. Además, se observaron otros dos fenotipos diferentes al CR⁺ de las cepas control: el primer fenotipo, denominado CR⁻, correspondía a colonias blancas y lisas, y el segundo fenotipo, denominado CR⁺⁺, correspondía a colonias más rugosas y bastante más rojas que las de la cepa control (CR⁺, Figura 34).

Tras crecimiento en placas con CF, los resultados fueron similares a los obtenidos en CR: en presencia de este compuesto y tras su exposición a luz UV, se distinguían tres tipos de colonias con claridad. Las colonias tipo CF⁻ no emitían fluorescencia, las CF⁺ lo hacían débilmente y las CF⁺⁺ exhibían una mayor fluorescencia y correspondían a las CR⁻, CR⁺ y CR⁺⁺, respectivamente (Figura 34C).

A continuación, se comprobó la presencia y funcionalidad del gen *pleD** en los transposantes CR⁻ seleccionados. Para verificar la presencia de *pleD**, se llevaron a cabo PCRs de colonias utilizando dos oligos que flanquean al gen *pleD** (pJB3Tc19F y pJB3Tc19R) y para comprobar la funcionalidad del mismo, se extrajo el plásmido de los distintos mutantes CR⁻ obtenidos que presentaron una amplificación positiva y se reintrodujo por electroporación en la cepa Pto silvestre. Todas las electroporaciones generaron colonias rojas CR⁺ similares a las obtenidas con la cepa control electroporada con el plásmido pJBpleD*. La presencia y funcionalidad de *pleD** en los diferentes transposantes seleccionados demuestra que el diferente fenotipo observado en dichos mutantes con respecto a la cepa silvestre es consecuencia de la inserción genómica del Tn5 y no de una alteración del plásmido pJBpleD*. Tras estas comprobaciones, se seleccionaron un total de 26 transposantes: 11 CR⁻ y 15 CR⁺⁺.

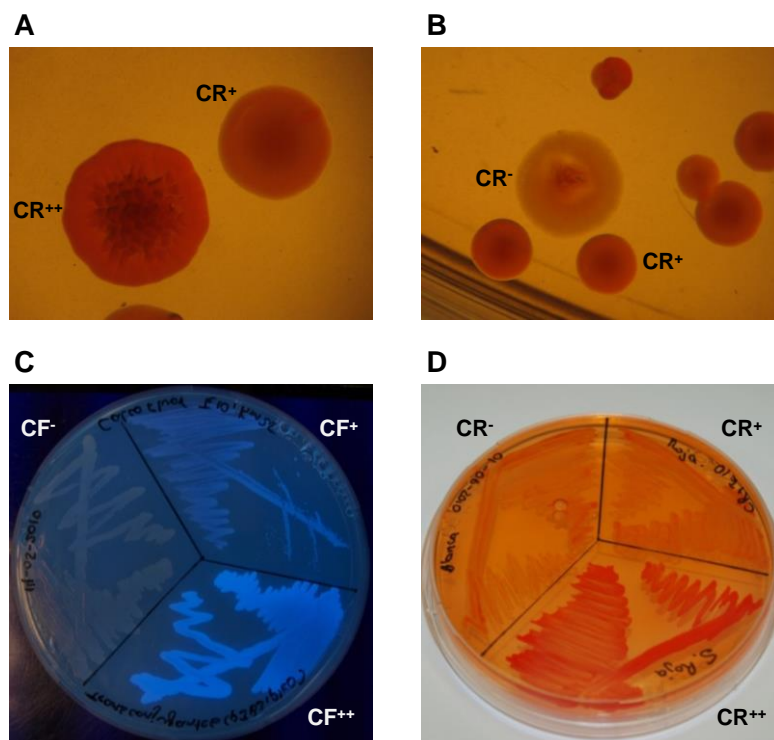


Figura 34. Fenotipos obtenidos en los fondos Pto y Pto *fliC* tras la mutagénesis con Tn5 en presencia de PleD*. La selección de los mutantes se llevó a cabo en placas de LB con Km (50 µg/ml), Tc (10 µg/ml) y CR (50 µg/ml), donde se observaron tres tipos diferentes de colonias: CR⁺, colonias rojas y lisas, similares a las de la cepas parentales portando el plásmido pJBpleD* (A y B); CR⁺⁺, colonias rojas y rugosas (A); CR⁻, colonias blancas y lisas (B). Crecimiento en estría de los tres tipos de colonias en placas con CF (200 µg/ml) bajo luz UV (C) y con CR (50 µg/ml) (D).

1.2. Mapeo de los mutantes obtenidos

Para localizar los genes en los que se había insertado el transposón en los 26 mutantes seleccionados, se extrajo su ADN cromosómico, se digirió con una enzima de restricción de alta frecuencia de corte en el genoma (*Csp6I*) y dicho ADN fue posteriormente religado bajo condiciones de religación intermolecular. A continuación, se realizó una PCR inversa con dos oligos que hibridan en los extremos y hacia el exterior del transposón (Tn5_F y Tn5_R, ver Material y Métodos). Los productos de PCR obtenidos se purificaron y se secuenciaron, localizándose la posición exacta de cada una de las inserciones (Figura 35). La mayoría de los mutantes con fenotipo CR⁻ (9 de 11) presentaba inserciones en distintos genes del operón de síntesis de la celulosa, mientras que los mutantes con fenotipo CR⁺⁺ presentaban inserciones en genes con diferentes funciones (Tabla 27 y Figura 35).

Tabla 27. Inserciones del Tn5 identificadas en las mutagénesis. Se indica el gen interrumpido y la descripción del mismo, el fenotipo correspondiente en CR y el número de inserciones identificado en cada caso.

ORF	Descripción	Fondo genético	Fenotipo	Número mutantes
PSPTO_1026	WssA, proteína de morfología celular	Pto	CR ⁻	1
PSPTO_1027	WssB, Celulosa sintasa	Pto <i>fliC</i>	CR ⁻	5
PSPTO_1030	WssE, proteína C	Pto/Pto <i>fliC</i>	CR ⁻	1/2
PSPTO_5022	Proteína hipotética	Pto	CR ⁻	1
PSPTO_5191	Proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF	Pto	CR ⁻	1
PSPTO_0463	Transportador ABC de glicina, betaína y L-prolina	Pto	CR ⁺⁺	4
PSPTO_1847	AmrZ, activador y represor transcripcional	Pto <i>fliC</i>	CR ⁺⁺	2
PSPTO_1994	Proteína transmembrana del complejo citocromo <i>cbb₃</i>	Pto	CR ⁺⁺	2
PSPTO_2004	CcoN, subunidad I de la citocromo oxidasa de tipo <i>cbb₃</i>	Pto	CR ⁺⁺	3
PSPTO_4631	MorA, proteína con dominios GGDEF y EAL	Pto	CR ⁺⁺	1
PSPTO_5409	RecQ, helicasa dependiente de ATP	Pto	CR ⁺⁺	3

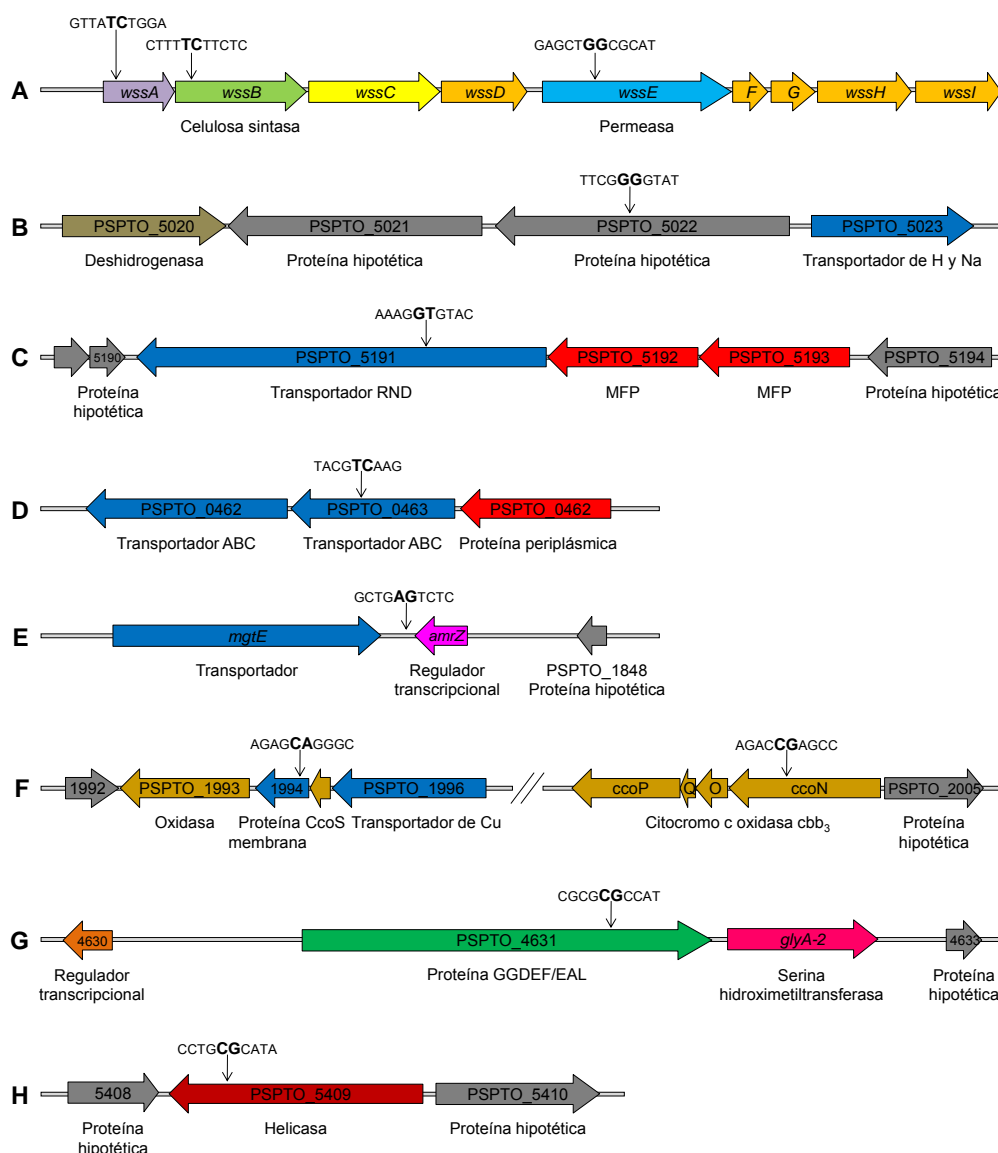


Figura 35. Mapeo de las inserciones del Tn5 identificadas en las distintas mutagénesis. Las flechas y las secuencias en negrita indican los dos nucleótidos entre los que se insertó el transposón, tanto en los mutantes con fenotipo CR⁻ (A-C), como en los que presentan fenotipo CR⁺⁺ (D-H).

1.2.1. Colonias CR⁻

Nueve mutantes con fenotipo CR⁻ presentaban inserciones del transposón en genes pertenecientes al hipotético operón *wssABCDEFGHI*, implicado en la producción, acetilación y secreción de celulosa en Pto (Tabla 27). Se obtuvieron inserciones en el gen *wssA* (PSPTO_1026), que codifica una proteína de morfología celular, en *wssB* (PSPTO_1027), que codifica la subunidad catalítica de la celulosa sintasa, y en *wssE* (PSPTO_1030), que codifica una proteína de membrana externa (proteína C) implicada en la translocación de la celulosa al medio externo (Tabla 27 y Figura 35A; Whitney y Howell, 2013). Los 9 mutantes localizados en el operón *wssABCDEFGHI*, además de presentar un fenotipo CR⁻ en presencia de PleD*, resultaron ser CF⁻, es decir, no emitían fluorescencia en placas suplementadas con CF bajo luz UV, al igual que ocurría con el mutante dirigido Pto $\Delta wssBC$ (Figuras 26 y 27 del Capítulo II). Estos resultados muestran que para el fenotipo CR⁺/CF⁺ en condiciones de altos niveles de c-di-GMP son necesarios, al menos, 4 genes de este operón: *wssA*, *B*, *C* y *E*.

Tal y como se ha demostrado en *Gluconacetobacter xylinus* y en otras bacterias, el c-di-GMP actúa como un activador alostérico de la celulosa, mediante la unión al dominio PilZ de la celulosa sintasa (Ross *et al.*, 1987; Fujiwara *et al.*, 2013). La presencia de este dominio en *wssB* (PSPTO_1027) sugiere que probablemente y de forma análoga a lo que ocurre en *G. xylinus*, el c-di-GMP esté activando alostéricamente la producción de este biopolímero en Pto. Sin embargo, no podemos descartar otros niveles de regulación, tal y como ocurre en otras bacterias. Por ejemplo, en *Burkholderia cenocepacia* la producción de celulosa está regulada por el c-di-GMP a nivel transcripcional. El regulador Bcam1349 se une a la región promotora de los genes de la celulosa sintasa, y con mayor afinidad en presencia de c-di-GMP, induciendo la expresión del operón *bcs* y, por tanto, la producción de celulosa (Fazli *et al.*, 2011).

Dentro de los mutantes con fenotipo CR⁻ que no se localizaron en el operón de la celulosa, se identificó una inserción dentro de un hipotético transportador (PSPTO_5191; Tabla 27 y Figura 35C). Esta proteína es similar a los transportadores AcrB, AcrD o AcrF presentes en bacterias Gram-negativas patógenas, tanto de animales como de plantas y pertenece a la superfamilia RND (*resistance, nodulation, cell division*; Tseng *et al.*, 1999; Nikaido, 2009). Los transportadores RND se organizan como sistemas tripartitos con un transportador de membrana interna, una proteína de fusión periplásmica y una proteína de membrana externa y utilizan la fuerza protón motriz para eliminar compuestos tóxicos desde el citoplasma o la membrana celular hasta el medio externo (Murakami *et al.*, 2002). En Pto el gen PSPTO_5191, la proteína de membrana interna, se expresa en operón con los genes PSPTO_5192 y PSPTO_5193, que codifican dos proteínas de fusión periplásmicas (V. Carvajal, resultados no publicados). Hasta el momento se desconoce cuál es la proteína de membrana externa que se acopla a este sistema y la función del mismo. En *E. coli* la proteína de membrana interna AcrB coopera con la proteína de fusión periplásmica AcrA y una proteína de membrana externa TolC expulsando un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran antibióticos lipofílicos y anfífilicos, agentes quimioterápicos, inhibidores metabólicos, colorantes, detergentes, biocidas, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos tóxicos, adhesinas, sales biliares e incluso homoserín-lactonas asociadas con *quorum sensing* (Murakami *et al.*, 2002; Poole, 2004; Piddock, 2006). Teniendo en cuenta el amplio rango de compuestos movilizados por este tipo de

transportadores, es posible que en Pto el sistema PSPTO_5191-PSPTO_5192-PSPTO_5193 esté implicado directa o indirectamente en la exportación de la celulosa o de algún precursor necesario para su ensamblaje, lo cual podría explicar el fenotipo CR⁻ en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Por otra parte, teniendo en cuenta que la celulosa sintasa es una proteína anclada a la membrana plasmática, no se puede descartar que la mutación en el transportador PSPTO_5191 tenga un efecto pleiotrópico alterando la membrana celular e impidiendo la correcta síntesis o secreción de la celulosa.

El otro mutante con fenotipo CR⁻ cuya inserción ocurrió fuera del operón de síntesis de la celulosa, es PSPTO_5022 (Tabla 27 y Figura 35B). Esta ORF codifica una proteína hipotética de función desconocida que presenta un dominio conservado con posible actividad glucosiltransferasa (GT, PF04488). El dominio GT posee el motivo DXD típico de estas enzimas y cataliza la unión de azúcares a diversos sustratos (Wiggins y Munro, 1998). Por tanto, es posible que, además de la indispensable actividad GT de la celulosa sintasa, la actividad GT de PSPTO_5022 se encuentre implicada en la síntesis, modificación o secreción de la celulosa en Pto.

1.2.2. Colonias CR⁺⁺

Dentro de los mutantes con fenotipo CR⁺⁺, se encontraron 4 inserciones en PSPTO_0463, 3 en PSPTO_2004 y PSPTO_5409, 2 en PSPTO_1994, 2 adyacentes a PSPTO_1847 y 1 inserción en PSPTO_4631 (Tabla 27, Figura 35).

Entre los mutantes con fenotipo CR⁺⁺ en presencia de *pleD*^{*} se identificaron 4 inserciones idénticas dentro del gen PSPTO_0463, anotado como un transportador de tipo ABC hipotéticamente implicado en el transporte de glicina, betaína y L-prolina (Tabla 27, Figura 35D), por lo que podría desempeñar un papel importante en la colonización de la planta hospedadora por Pto. Sin embargo, la razón por la cual el mutante en el gen PSPTO_0463 en presencia de altos niveles de c-di-GMP tiene un fenotipo CR⁺⁺, se desconoce.

Se obtuvieron 2 inserciones idénticas 29 pb por debajo del codón de stop del gen PSPTO_1847 (Tabla 27, Figura 35E). La proteína PSPTO_1847 presenta homología con un regulador transcripcional de *P. aeruginosa* llamado AmrZ (*alginate and motility regulator*; Tart *et al.*, 2005; Baynham *et al.*, 2006; Tart *et al.*, 2006). Dicho regulador puede actuar como activador y como represor transcripcional y está implicado en la regulación de la biosíntesis y secreción de diferentes polisacáridos, como alginato y Psl, de la motilidad bacteriana y biosíntesis de *pili* tipo IV en diferentes bacterias del género *Pseudomonas* (Baynham *et al.*, 2006; Tart *et al.*, 2006; Irie *et al.*, 2012). En *P. fluorescens* se ha propuesto que AmrZ podría estar implicado además en la represión del operón de síntesis de la celulosa (Giddens *et al.*, 2007). La inserción del transposón en una región tan próxima al marco abierto de lectura hace posible que el fenotipo CR⁺⁺/CF⁺⁺ observado en presencia de *pleD*^{*} pueda ser debido a la pérdida o a la ganancia de función del producto génico codificado por PSPTO_1847. La implicación de PSPTO_1847 en la regulación del operón de síntesis de celulosa en Pto se estudió con más detalle en el Capítulo IV.

También se identificaron 2 inserciones idénticas dentro del gen PSPTO_1994 anotado como una proteína de membrana (Tabla 27, Figura 35F). Esta proteína tiene un dominio transmembrana DsbD

implicado en la biogénesis de citocromos tipo C a través de la formación de puentes disulfuro (Crooke y Cole, 1995; Heras *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012). Asimismo, se identificaron 3 inserciones idénticas dentro del gen PSPTO_2004, anotado como la subunidad I de la citocromo oxidasa de tipo *cbb₃*, CcoN (Tabla 27, Figura 35F). El complejo citocromo oxidasa (CCO) *cbb₃* se expresa predominantemente en condiciones de baja tensión de oxígeno y se caracteriza por su alta afinidad por el mismo (Preisig *et al.*, 1996; Pitcher *et al.*, 2002). Se ha demostrado que, por ejemplo, en los diazótrofos simbióticos, las CCO *cbb₃* proporcionan la energía necesaria para el proceso de fijación de N₂ protegiendo además a la nitrogenasa, sensible al oxígeno, mediante su eliminación (Arslan *et al.*, 2000). En algunos patógenos humanos, como *Helicobacter pylori* o *Neisseria meningitidis*, la CCO *cbb₃* es la única oxidasa respiratoria codificada por el genoma y se cree que es crucial para la colonización del hospedador en condiciones de microaerobiosis (Pitcher y Watmough, 2004). Aunque la presencia de dos operones *cbb₃* en el género *Pseudomonas* es bastante común (por ejemplo, en *P. aeruginosa* o *P. putida*), el patógeno de plantas *P. syringae* posee sólo una CCO *cbb₃* (Comolli y Donohue, 2004; Cosseau y Batut, 2004).

Además de la reducción de oxígeno molecular, las CCOs *cbb₃*, que están estructural y filogenéticamente relacionadas con reductasas del óxido nítrico (NORs) bacterianas, son capaces de reducir NO a una velocidad superior que las CCO de las familias A y B (Forte *et al.*, 2001; Ducluzeau *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Hino *et al.*, 2010). El NO actúa como una molécula de señalización que provoca la dispersión de las biopelículas y en *P. aeruginosa* se ha puesto de manifiesto que lo hace disminuyendo los niveles de c-di-GMP mediante la inducción de las actividades PDE de MucR y NbdA (Li *et al.*, 2013). Probablemente la actividad NO-reductasa de las CCOs *cbb₃* de Pto tenga un papel importante en la transición de un estilo de vida sésil a un estilo de vida libre a través de la regulación de los niveles celulares de NO y, por consiguiente, de c-di-GMP.

Dentro del gen PSPTO_4631 se identificó una única inserción asociada a un fenotipo CR⁺⁺ en presencia de *pleD** (Tabla 27, Figura 35G). PSPTO_4631 codifica una proteína de 1278 aminoácidos homóloga a MorA (del inglés *motility regulator*) de *P. aeruginosa* o *P. putida*. En el extremo N-terminal de la proteína se localizan 2 dominios transmembrana y 4 dominios sensores PAS, y en el extremo C-terminal presenta los motivos GGDEF y EAL, ambos hipotéticamente activos (Figura 36A). No solo *morA* se encuentra ampliamente conservada dentro del género *Pseudomonas* sino también el gen situado en 3' (PSPTO_4632 en Pto), que codifica una serina hidroximetiltransferasa (SHMT, Figura 36B). Mutantes carentes de MorA en *P. putida* y en *P. aeruginosa* están afectados en la formación de biopelículas, por lo que probablemente es necesaria su actividad DGC bajo las condiciones ensayadas en esas bacterias (Choy *et al.*, 2004). Asimismo, en *P. putida* pero no en *P. aeruginosa*, MorA está implicada en la represión de *fliC*, dado que mutantes carentes de MorA muestran un incremento en la expresión de la flagelina y una mayor motilidad tipo *swimming* (Choy *et al.*, 2004). No hay que olvidar que el proceso de selección de mutantes se realizó con la aportación de altos niveles intracelulares de c-di-GMP generados mediante la actividad DGC exógena de *PleD**, lo que, sumado a la potencial actividad dual de PSPTO_4631 (PDE⁺/DGC⁺, Capítulo I), hace difícil discernir el papel de esta proteína en el fenotipo CR⁺⁺. Asimismo, no podemos descartar un efecto polar de la inserción del Tn5 sobre la expresión de PSPTO_4632 y que esta

proteína tenga un papel en la generación del fenotipo CR⁺⁺, dada la cercanía de ambos genes y su conservación.

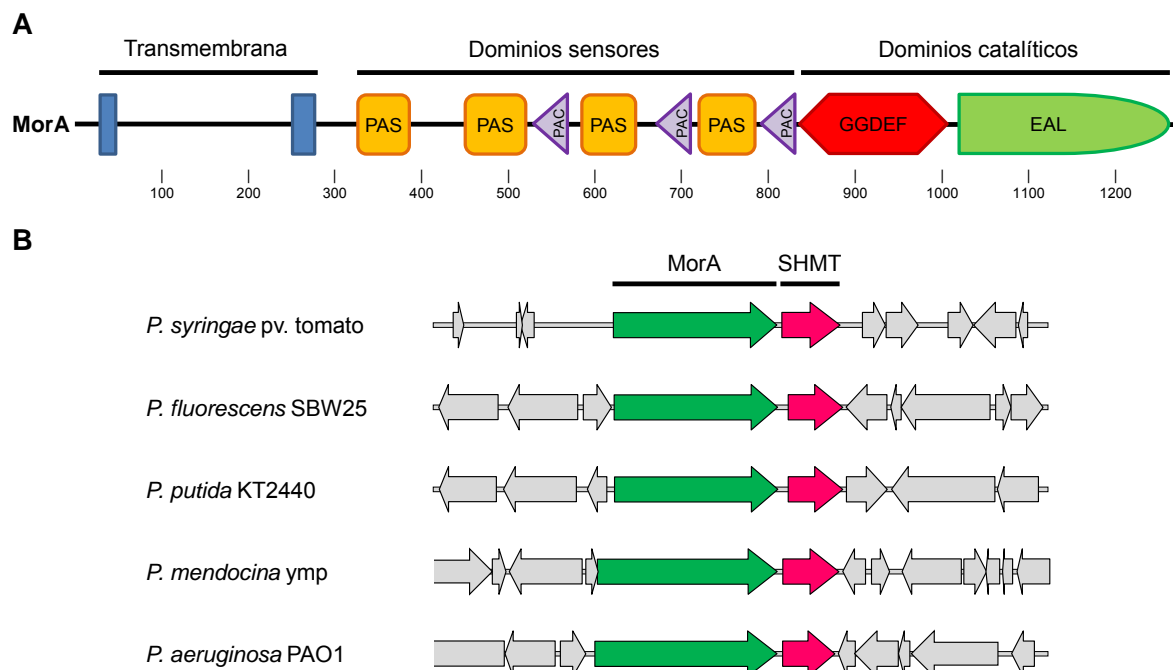


Figura 36. Conservación de MorA en el género *Pseudomonas*.

A. Esquema de los dominios de PSPTO_4631. Existe un dominio transmembrana situado en el extremo N-terminal, varios dominios sensores PAS acompañados de dominios PAC y una región catalítica constituida por un motivo GGDEF y un motivo EAL.

B. Esquema del contexto génico de *morA* en varias *Pseudomonas*. Las flechas corresponden a las ORFs: en verde, *morA*; en rosa, *glyA*, una serina hidroximetiltransferasa (SMHT) y en gris las ORFs adyacentes.

En último lugar, se obtuvieron 3 inserciones idénticas dentro del gen PSPTO_5409 anotado como RecQ, una helicasa dependiente de ATP (Tabla 27, Figura 35H). Estas enzimas son importantes para la replicación del material genético ya que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para romper los puentes de hidrógeno, desenrollando el ADN y permitiendo que la DNA polimerasa III duplique el ADN (Johnson *et al.*, 2007). La relación de este mutante con el fenotipo CR⁺⁺ obtenido en presencia de PleD* es desconocida hasta el momento.

En resumen, de las mutagénesis realizadas con el transposón Tn5 en Pto, se obtuvieron mutantes CR⁺⁺ en genes con funciones variadas, lo que hace interesante su estudio; pero la relación de esos genes con el c-di-GMP y el fenotipo CR⁺⁺ es desconocida.

2. Caracterización de los mutantes Tn5 en vida libre

Como primera medida para la caracterización, todos los mutantes identificados fueron curados del plásmido pJBpleD* con el fin de dilucidar si los genes interrumpidos por el transposón Tn5 tenían alguna implicación en los distintos procesos celulares bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP. Para ello se llevaron a cabo varios pases en medio líquido de LB sin el antibiótico de selección codificado por el plásmido pJBpleD* (Tc) y posteriormente se seleccionaron en placas de LB colonias Km^R (resistencia generada por el transposón) y Tc^S. Una vez curados del plásmido pJBpleD*, todos los mutantes Tn5 se caracterizaron estudiando su motilidad, capacidad de producción de exopolisacáridos y su interacción con la planta.

2.1. Motilidad

2.1.1. Motilidad tipo *swimming*

El movimiento de tipo *swimming* se ha definido como el desplazamiento individual de bacterias en medios líquidos o viscosos dependiente de flagelo (Mitchell y Kogure, 2006; Guttenplan y Kearns, 2013). Numerosas cepas de *P. syringae* se mueven de este modo en medios con baja concentración de agar (Shimizu *et al.*, 2003; Toutain *et al.*, 2005). En LB (0,3% agar) se observan halos de dispersión de Pto DC3000 a partir del punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo (Figura 37). Los mutantes identificados en el fondo Pto *fliC*, tal y como era de esperar al carecer del principal componente del flagelo (flagelina, codificada por *fliC*), no presentaron motilidad tipo *swimming* detectable. Entre los mutantes obtenidos en el fondo genético silvestre, únicamente las inserciones en PSPTO_2004 y PSPTO_4631 presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa control (Figura 38). El mutante en PSPTO_2004, que codifica la subunidad CcoN de la CCO cbb₃, mostró una disminución en motilidad respecto a la cepa parental, mientras que el mutante en PSPTO_4631, que codifica una proteína con dominios GGDEF y EAL en tándem, resultó ser más mótil que la cepa control.

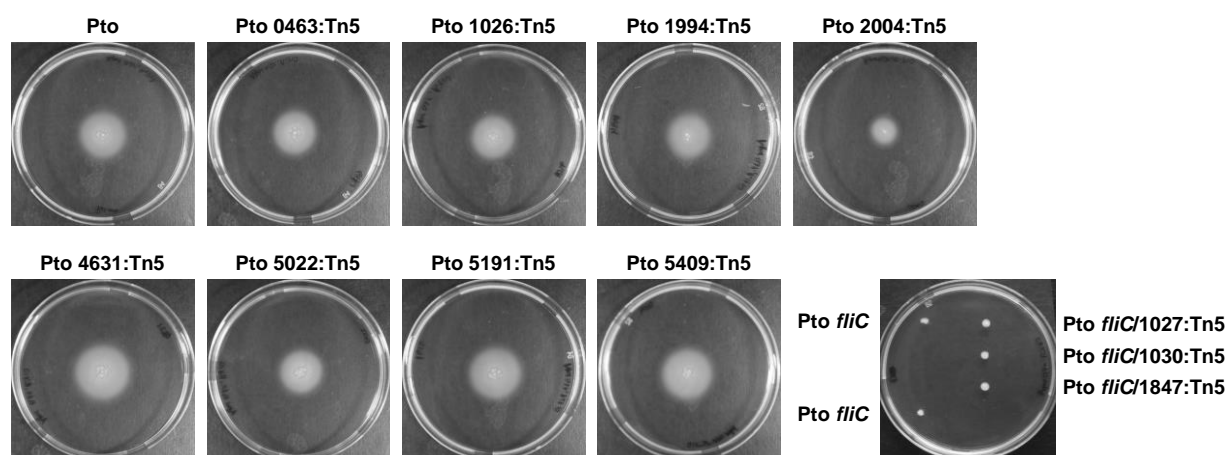


Figura 37. Motilidad tipo *swimming* de los distintos mutantes Tn5. 2 µl de una suspensión bacteriana de los mutantes y de sus respectivos controles Pto y Pto *fliC* ajustada a una DO₆₆₀=2,0 se pincharon en placas de LB (0,3% agar) y se incubaron durante 48 h a 25°C, tras lo cual se tomaron las fotos.

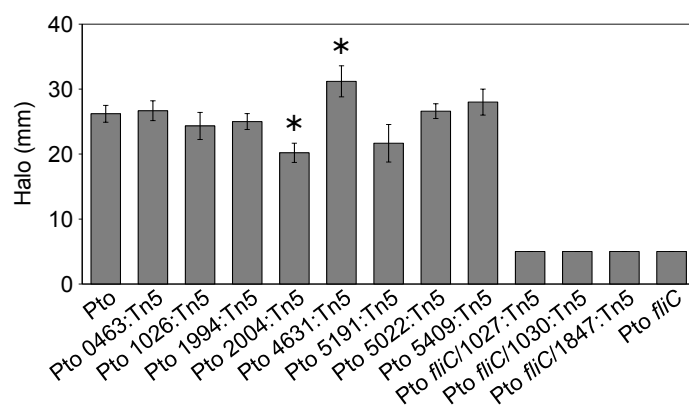


Figura 38. Diámetro de los halos de *swimming* de los distintos mutantes Tn5. La medida de los halos se realizó a las 48 h y en la gráfica se muestra la media de 5 experimentos independientes con sus respectivas desviaciones típicas. Los asteriscos indican que las diferencias con respecto a la cepa silvestre son significativas determinado mediante análisis de la varianza ($P < 0,05$).

2.1.2. Motilidad tipo *swarming*

La motilidad tipo *swarming* es un movimiento rápido y coordinado de una población bacteriana sobre superficies sólidas o semisólidas que es dependiente de flagelo y *pili* tipo IV (Murray y Kazmierczak, 2006). Pto DC3000 presenta un movimiento de tipo *swarming* muy rápido en medios ricos con baja concentración de agar, pero no en medios mínimos, como MMF (Vargas *et al.*, 2013). En PG-agar (0,5%) se observan halos de dispersión desde el punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo y alcanzan el borde de las placas de 80 mm de diámetro a las 40-48 h. Al igual que en los ensayos de *swimming*, los mutantes en el fondo Pto *fliC* no presentaron motilidad tipo *swarming* y únicamente las inserciones en PSPTO_2004 y PSPTO_4631 mostraron diferencias significativas, con una disminución y un incremento, respectivamente, en motilidad con respecto a la cepa control. Asimismo, el mutante en PSPTO_1994 presentaba motilidad tipo *swarming*, pero su apariencia era distinta a la del resto de las cepas (más seca y rugosa) y con un patrón de *swarming* más dendrítico (Figura 39).

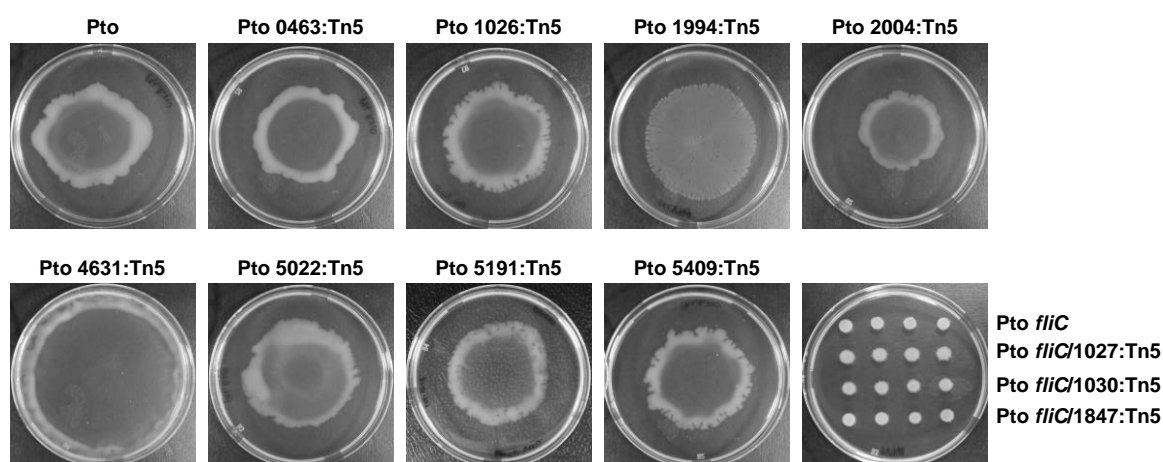


Figura 39. Motilidad tipo *swarming* de los distintos mutantes Tn5. 2 μ l de una suspensión bacteriana de los mutantes y de sus respectivos controles (Pto y Pto *fliC*) ajustada a una $DO_{660}=2,0$ se depositaron en la superficie de placas de PG-agar (0,5% agar) y se incubaron durante 48 h a 25°C, tras lo cual se tomaron las fotos.

El mutante en el gen PSPTO_4631 (*morA*) presentó un incremento en motilidad, tanto *swimming* como *swarming*, con respecto a la cepa control. Este comportamiento es similar al descrito para el correspondiente mutante de *P. putida*, donde se ha observado que MorA ejerce un efecto represor sobre la expresión del gen que codifica la flagelina (Choy *et al.*, 2004). Al igual que en *P. putida*, en Pto un mutante en la ORF PSPTO_4631 posee un mayor número de flagelos que la cepa silvestre (Figura 40). Todo esto sugiere que, aunque PSPTO_4631 posee dominios GGDEF y EAL hipotéticamente activos, parece tener actividad DGC bajo las condiciones ensayadas. Probablemente, el pool de c-di-GMP producido por esta proteína a través de su dominio GGDEF podría regular negativamente la motilidad bacteriana a nivel transcripcional y positivamente la producción de EPS.

El mutante en la ORF PSPTO_2004, por su parte, presentó una disminución significativa en motilidad comparado con la cepa control. La razón por la cual este mutante está afectado en motilidad, tanto *swimming* como *swarming*, es desconocida.

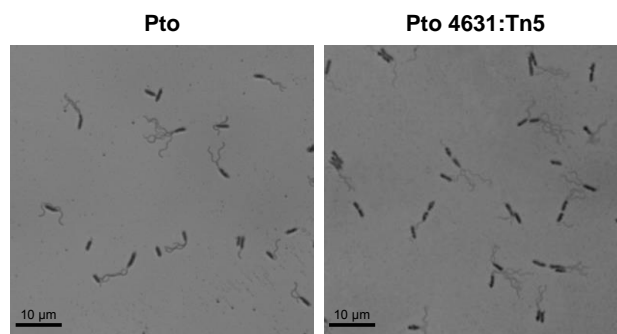


Figura 40. Visualización de la abundancia flagelar en células de Pto y Pto 4631:Tn5. Las cepas se resuspendieron de placas de *swarming* en MgCl₂ 10 mM, se ajustaron a DO₆₆₀=1,0 y se tiñeron siguiendo el protocolo de Clark (1976) para su observación en el microscopio óptico (ver apartado 9.1 de Materiales y métodos).

2.2. Producción de exopolisacáridos

Inicialmente se evaluaron todos los mutantes en placas de CR y CF con el fin de comprobar si los distintos mutantes Tn5 identificados presentaban alguna alteración del fenotipo observado en ausencia de PleD*, es decir, bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP. Se observa que todos los mutantes presentan la misma apariencia que las respectivas cepas control, tanto en CR como en CF (Figura 41). Por tanto, el fenotipo CR⁺⁺/CF⁺⁺ ocurre únicamente en presencia de PleD* y ninguna de las mutaciones por sí misma es capaz de generarlo. Es importante resaltar que tampoco se detectan diferencias entre los distintos mutantes CR⁻ y las respectivas cepas parentales (Pto y Pto *fliC*). Esto sugiere que, en las condiciones de laboratorio ensayadas, la producción de celulosa en las cepas control en ausencia de PleD* es nula o muy baja y posiblemente las diferencias con los mutantes celulosa⁻ son tal sutiles que no se pueden detectar en las placas de CR o CF.

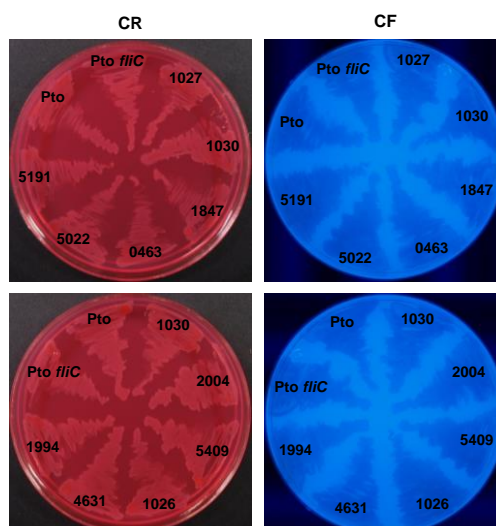


Figura 41. Fenotipos de los mutantes Tn5 de Pto en CR y CF. En la figura se muestra una foto representativa de los distintos mutantes Tn5 en los fondos Pto y Pto *fliC* a las 48h. Los mutantes curados de pJBpleD* se crecieron en placas de MMR suplementado con CR (50 µg/ml) o CF (200 µg/ml) durante 48 h a 20°C. Las placas con CF se observaron bajo luz UV.

A continuación, se procedió a evaluar la producción de celulosa en los mutantes CR-/CF- y CR+/CF+ identificados mediante la cuantificación de la fluorescencia generada por cultivos líquidos de dichos mutantes suplementados con CF (Figura 42). Teniendo en cuenta que obtuvimos tres tipos de inserciones dentro del operón de la celulosa (en los genes PSPTO_1026, PSPTO_1027 y PSPTO_1030) con un fenotipo idéntico, decidimos utilizar el mutante con la inserción en el primer gen del operón (Pto 1026:Tn5). De esta manera se cuantificaron los niveles de celulosa en los mutantes Pto 1026:Tn5, Pto 5022:Tn5 y Pto 5191:Tn5 (CR-/CF-), tanto en presencia como en ausencia de PleD*. A su vez, como representante de los mutantes con fenotipo CR+/CF+ seleccionamos el mutante Pto *fliC*/1847:Tn5. De dichos experimentos se pudieron extraer diferentes conclusiones:

(i) Todos los mutantes CR- identificados presentaron niveles de producción de celulosa muy inferiores a los de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de *pleD** (Figura 42). Esto confirma la validez de la estrategia empleada para la identificación de mutantes de Pto deficientes en su producción.

(ii) Los niveles de producción de celulosa en los mutantes Pto 1026:Tn5 y 5022:Tn5 fueron muy bajos y no variaron en presencia de altos niveles de c-di-GMP. De hecho, la producción de celulosa fue incluso menor que la mostrada por la cepa silvestre en ausencia de PleD*. Esto indica que, aunque mínima, existe una producción basal de celulosa en la cepa silvestre bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP en las condiciones de laboratorio ensayadas (en ausencia de PleD*) y que la producción de celulosa en dichos mutantes es inexistente. Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto que en Pto no basta la presencia del operón *wssABCDEFGH* intacto, sino que existen otros genes necesarios para la síntesis y/o transporte de este polímero, como PSPTO_5022.

(iii) En el mutante Pto 5191:Tn5, sin embargo, sí aumenta la producción de celulosa en presencia de PleD*, aunque menos que en la cepa silvestre (5 veces en Pto 5191:Tn5 y 20 veces en Pto DC3000) y, además, los valores absolutos de producción son mucho menores (Figura 42). Teniendo en cuenta esta deficiencia parcial y la posible función de esta proteína como transportador (ver apartado 1.2.1 de este Capítulo), es probable que este mutante no esté afectado en la producción de celulosa *per se*, ya que el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP activa alostéricamente su síntesis, sino más bien en su transporte al exterior de la célula.

(iv) Por último, el mutante Pto *fliC*/1847:Tn5 mostró un incremento en la producción de celulosa respecto a la cepa parental en ausencia de PleD*. Esto sugiere que AmrZ probablemente regule negativamente la producción de este polímero en Pto. Sin embargo y dado que el transposón se insertó 29 pb por debajo del gen (Figura 35E), no está claro si el Tn5 está potenciando o disminuyendo la expresión *amrZ*.

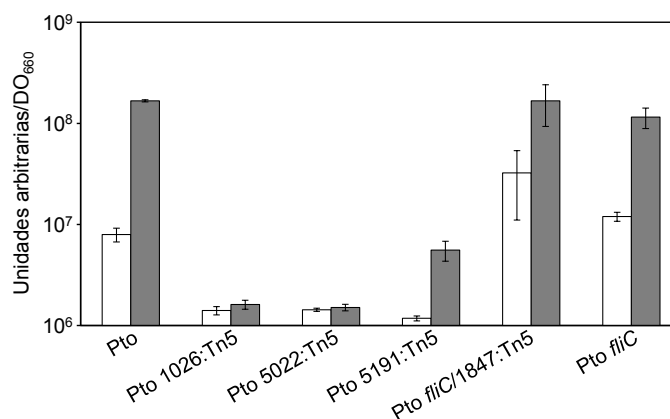


Figura 42. Medida de la producción de celulosa por mutantes de Pto. Cultivos de Pto, Pto 1026:Tn5, Pto 5022:Tn5, Pto 5191:Tn5, Pto *fliC*/1847:Tn5 y Pto *fliC* en ausencia (blanco) y presencia de PleD* (gris) se crecieron en MMR en presencia de CF durante 24 h a 20°C. La fluorescencia emitida por los cultivos se midió en el fluorímetro PTI (Photon Technology International, ver apartado 7.1.2. de Materiales y métodos). Las barras corresponden a la desviación estándar de las medidas de 3 réplicas biológicas de cada cepa, expresando los resultados en unidades arbitrarias/DO₆₆₀.

2.3. Fenotipo en planta

A continuación se llevaron a cabo ensayos de infección en plantas de tomate con objeto de determinar si los distintos mutantes Tn5 presentaban alguna alteración (incremento o disminución) en virulencia. La virulencia de Pto DC3000 y sus mutantes se evaluó analizando el desarrollo de los síntomas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cultivar MoneyMaker) a lo largo del tiempo. En primer lugar, se llevó a cabo un primer *screening* de todos los mutantes tras su inoculación por infiltración (ver apartado 7.4. de Materiales y Métodos), para después llevar a cabo una caracterización más detallada inoculando por rociado solo aquellos que se comportaron de forma diferente a la cepa silvestre.

2.3.1. Inoculación por infiltración

Para llevar a cabo los ensayos de infección mediante infiltración se utilizaron títulos de inóculo de 10^6 ufc/ml para conseguir una población inicial de 10^4 ufc/cm² en el apoplasto de la hoja. Esto es suficiente para que la infección con la cepa silvestre prospere, provocando el desarrollo normal de síntomas: formación de lesiones acuosas claramente visible desde los 3 dpi, clorosis de los tejidos a los 5-6 dpi, seguida de la aparición de lesiones necróticas alrededor de los 10 dpi (Figura 43).

No se observaron diferencias significativas entre los síntomas provocados por la cepa silvestre y los mutantes en los genes PSPTO_0463, PSPTO_1026, PSPTO_1994, PSPTO_2004 y PSPTO_5409. Sin embargo, sí se observó una disminución en virulencia en el caso de los mutantes en los genes PSPTO_5022, PSPTO_4631 y PSPTO_5191 (Figura 43). Curiosamente, el mutante Pto *fliC*, que carece de flagelo y de motilidad *swimming*, resultó ser más virulento que la cepa silvestre, contrariamente a lo observado en *P. syringae* pv. *tabaci*, en donde mutantes en este mismo gen no provocaban síntomas en su correspondiente planta hospedadora (Ichinose *et al.*, 2003).

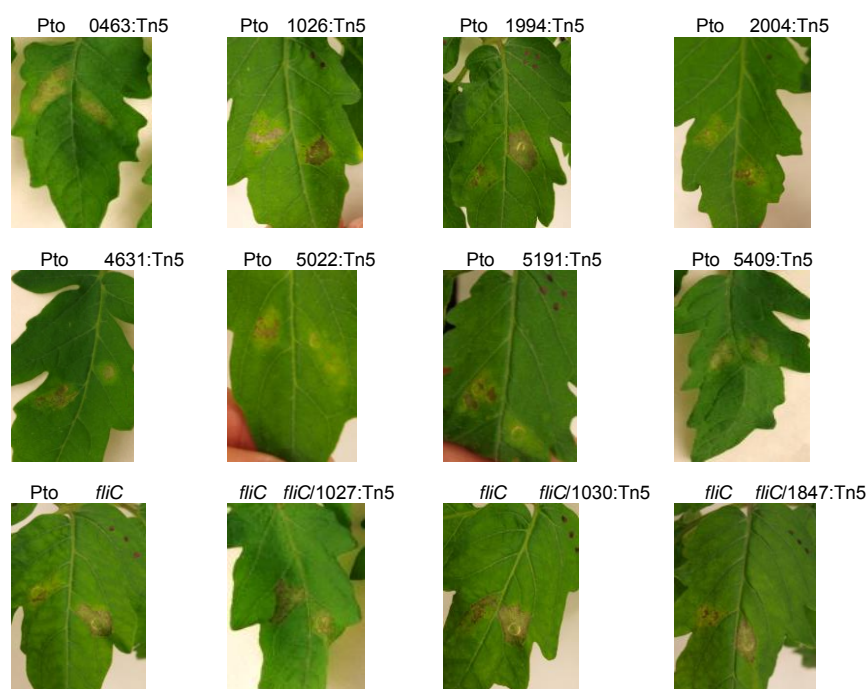


Figura 43. Sintomatología causada por los distintos mutantes Tn5 y por los respectivos controles Pto y Pto *fliC*. Fotografía de hojas de tomate a los 5 dpi por infiltración con 10^6 ufc/ml de las cepas control Pto y Pto *fliC* (izquierda de la hoja) y los respectivos mutantes Tn5 (derecha de la hoja).

2.3.2. Inoculación por rociado

A continuación, se procedió a caracterizar los mutantes PSPTO_5022, PSPTO_4631 y PSPTO_1026, en los que se había observado una disminución en virulencia, inoculándolos en tomate mediante rociado. Este método de infección se utilizó porque es más idóneo para el estudio de posibles alteraciones en los estadios iniciales de la interacción con el hospedador (supervivencia en hoja, adhesión, invasión y colonización). La infección se realizó utilizando un título alto de inóculo (10^7 ufc/ml) para conseguir una

población inicial en el apoplasto suficiente para que prosperara la infección con la cepa silvestre (superior a 10^4 ufc/cm² de hoja).

El título inicial de todas las cepas se determinó a las 3 h post-inoculación (tiempo 0), observándose que todas eran similares y cercanas a 10^5 ufc/cm² (Figura 44A). El tamaño de las poblaciones de Pto y Pto1026:Tn5 alcanzó un máximo en la hoja de tomate a los 3 dpi de $4,30 \times 10^6$ y $3,94 \times 10^6$ ufc/cm², respectivamente. Así, la evolución de la población del mutante Pto 1026:Tn5 y el desarrollo de los síntomas fueron similares a los provocados por la cepa parental, lo que indica que la celulosa no es un factor de virulencia clave en la patogénesis de Pto, al menos en las condiciones ensayadas. El mutante Pto 5022:Tn5 no presentó problemas a la hora de establecerse en hoja, pero no fue capaz de multiplicarse en ella y su población permaneció estable hasta que empezó a descender a partir de 6 dpi (Figura 44A). Se observa un retraso en el desarrollo de los síntomas provocados por Pto 5022:Tn5 con respecto a la cepa parental (Figura 44B), probablemente consecuencia de la deficiencia en invasión y/o colonización que presenta este mutante (Figura 44A). El mutante Pto 4631:Tn5, sin embargo, si fue capaz de multiplicarse en hoja, aunque mucho menos que la cepa silvestre (su población incrementó de $3,94 \times 10^5$ ufc/cm² hasta $1,07 \times 10^6$ ufc/cm²). También se observa en este caso un retraso en el desarrollo de los síntomas (Figura 44B), probablemente porque este mutante no es capaz de invadir y/o colonizar la hoja de tomate como la cepa silvestre (Figura 44A).

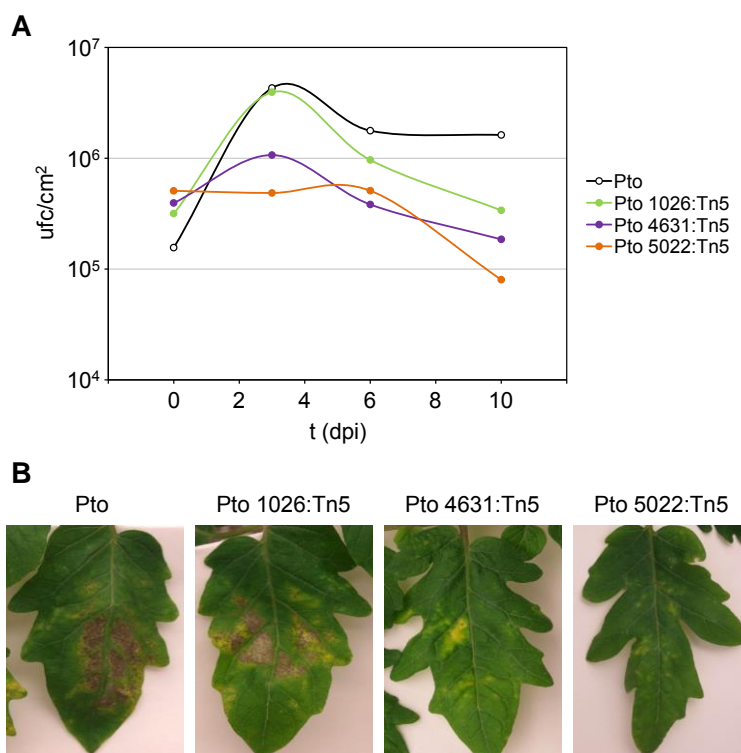


Figura 44. Evolución de las poblaciones bacterianas y desarrollo de síntomas en hojas de tomate tras inoculación mediante rociado.

A. Seguimiento de la supervivencia y crecimiento en hojas de tomate de los mutantes de Pto seleccionados a lo largo del tiempo con relación a la cepa silvestre. Se determinó el número de ufc/cm² de hoja a diferentes días post-inoculación (dpi) por rociado con una solución bacteriana con 10^7 ufc/ml. Los datos representan el promedio de cuatro experimentos diferentes.

B. Imágenes representativas del desarrollo de síntomas inducidos por los diferentes mutantes en hojas de tomate a los 9 dpi.

Por tanto, de todos los mutantes analizados solo los que presentan inserciones en PSPTO_4631 y PSPTO_5022 resultaron ser menos virulentos. En el caso del mutante en PSPTO_4631, presenta mayor motilidad *swimming* y *swarming* y mayor número de flagelos que la cepa parental (Figuras 37-40), posiblemente como consecuencia de la alteración de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Por lo tanto, es probable que la deficiencia en virulencia observada con el mutante Pto 4631:Tn5 sea consecuencia de sus alteraciones en motilidad. En ese sentido, los resultados obtenidos hasta ahora indican que en Pto la motilidad no es un determinante de virulencia, ya que, tanto la cepa silvestre con PleD* como los mutantes carentes de *fleQ* y *fliC*, que no son mótils, no están afectados en virulencia. Sin embargo, los síntomas provocados por una cepa hipermótil como Pto 4631:Tn5 son mucho menos severos, lo que sugiere que la motilidad descontrolada constituye un impedimento para la virulencia.

En el caso del mutante en PSPTO_5022, el hipotético polisacárido capsular en cuya síntesis estaría implicada esa proteína, podría actuar como un factor de virulencia desempeñando un importante papel en la colonización e invasión del apoplasto de la planta por Pto, y debido a su novedad, constituye una interesante línea de estudio para trabajos futuros. En soporte de esta hipótesis se han caracterizado polisacáridos capsulares importantes para la virulencia en varias cepas patógenas de humanos (Jiang *et al.*, 2001; Reinert *et al.*, 2005).

CAPÍTULO IV

Regulación de la síntesis de celulosa en Pto DC3000

1. Operón de síntesis de celulosa en Pto DC3000

En los capítulos II y III se ha puesto de manifiesto que la celulosa es el componente al que mayoritariamente se unen el CR y CF, y que su producción, al igual que se ha observado en otros microorganismos, es activada por c-di-GMP (Ross *et al.*, 1987; Spiers *et al.*, 2002; Römling, 2005; Kader *et al.*, 2006; Goymer *et al.*, 2006; Malone *et al.*, 2007; Fujiwara *et al.*, 2013; Whitney y Howell, 2013). Tal y como se indica en el capítulo II, Pto porta un putativo operón denominado *wssABCDEFGHI* (Buell *et al.*, 2003). Dichos genes presentan una alta homología de secuencia y una organización similar a la del operón *wssABCDEFGHIJ* de *P. fluorescens* SBW25, cuyos productos participan en la síntesis, acetilación y transporte de la celulosa (Römling *et al.*, 2002; Spiers *et al.*, 2002; 2003; Whitney y Howell, 2013). Con objeto de estudiar la organización transcripcional de los genes *wssABCDEFGHI* de Pto, se procedió a determinar su inicio de la transcripción y si se expresan como operón.

1.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes *wssABCDEFGHI*

En Pto, la distancia entre ORFs adyacentes es mínima en la mayoría de los casos y los codones de terminación y de inicio de *wssA* y *wssB* y de *wssF* y *wssG* se solapan, sugiriendo que formaban una única unidad transcripcional. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos complementarios a regiones correspondientes al final y al inicio de los genes consecutivos (*wssA-wssB*, *wssD-wssE*, *wssE-wssF* y *wssF-wssG*) y distintas combinaciones de ellos (Figura 34). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose fragmentos de amplificación del tamaño esperado para cada pareja de cebadores. No se observó amplificación en los controles negativos, a los que no se añadió reverso transcriptasa, lo que indica la ausencia de ADN contaminante en la reacción (no mostrado).

La amplificación obtenida a partir del transcrito, entre la región final de un gen y la región inicial del siguiente y en algunos casos entre varios genes, permite afirmar que *wssABCDEFGHI* forman parte de la misma unidad transcripcional y constituyen un operón.

1.2. Localización del punto de inicio de la transcripción del promotor del operón *wssABCDEFGHI*

Para definir la región promotora del operón *wssABCDEFGHI* y determinar el punto de inicio de la transcripción se realizaron ensayos de extensión reversa (Figura 35). Los resultados mostraron que el operón *wss* se transcribe a partir de un único promotor (Figura 35A), ya que se observa una banda específica de ADNc correspondiente al transcrito de este operón. Además, la intensidad de la banda obtenida resultó mayor en la cepa portadora del plásmido pJB3pleD* en comparación con la cepa con pJB3Tc19, lo que sugiere que los altos niveles de c-di-GMP inducen la transcripción de este operón. Hemos identificado el sitio de iniciación de la transcripción de *wssA* en la T localizada 67 pb por encima del primer ATG. El análisis detallado de esta región permitió predecir las cajas -10 (GTCACA) y -35 (GCCATA) del promotor *wss*, que están separadas entre sí por 18 pb (Figura 35B) y que, en principio, podrían ser reconocidas por el factor de transcripción σ^{70} de la ARN polimerasa (Lisser y Margalit, 1993).

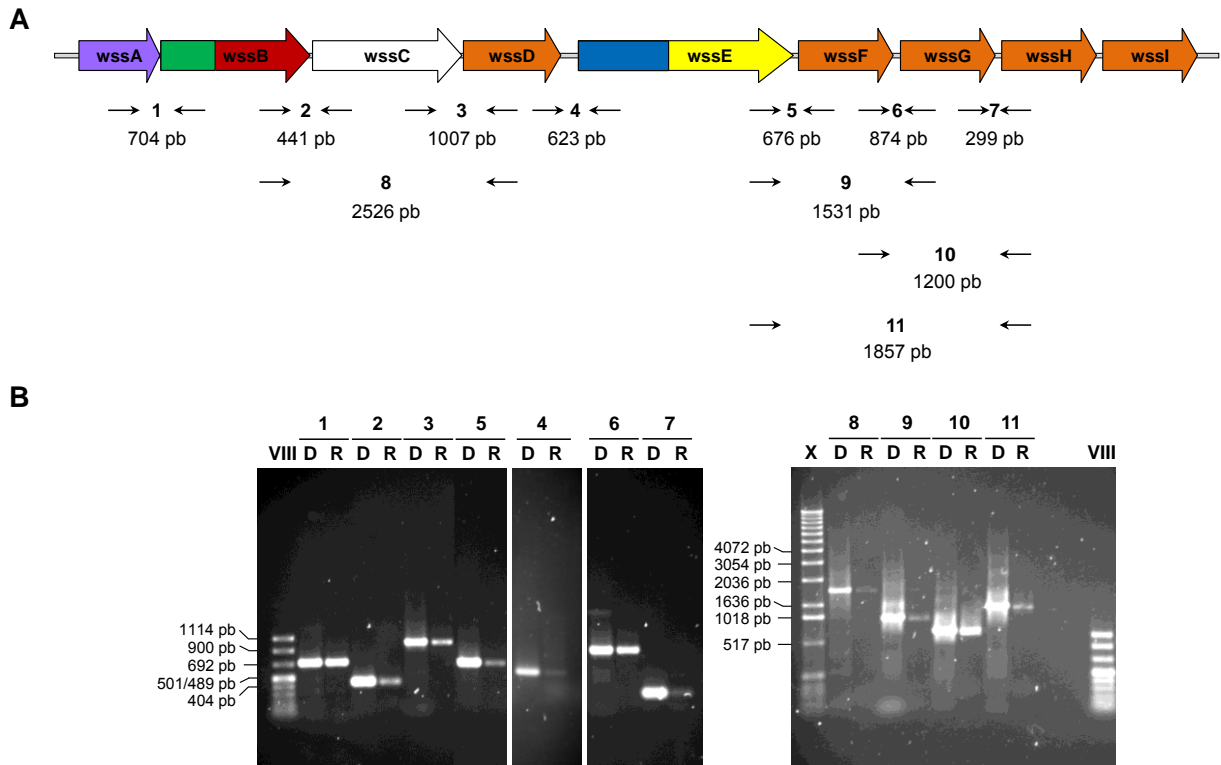


Figura 34. Análisis de la organización transcripcional de los genes *wssABCDEFghi* en Pto DC3000 mediante RT-PCR.

A. Representación esquemática de la organización de los genes implicados en la síntesis de la celulosa *wssABCDEFghi* donde los diferentes marcos abiertos de lectura se representan con flechas anchas. Se indica también la localización de los cebadores usados para la amplificación del ARN total en el ensayo de RT-PCR como flechas debajo de los genes, así como el tamaño esperado del ADNc amplificado. *wssA*, proteína de morfología celular; *wssB*, celulosa sintasa; *wssC*, proteína hipotética; *wssD*, endoglucanasa; *wssE*, porina; *wssF*, *wssG*, *wssH* y *wssI*, proteínas implicadas en modificaciones postraduccionales.

B. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR. La reacción 1 corresponde a la amplificación con los cebadores 1026_F y *wssB*_R; la reacción 2, con *wssB*_F y *wssC*_R; la reacción 3, con *wssC*1_F y 1029_R; la reacción 4 con *wssD*_F y *wssE*2_R; la reacción 5, con *wssE*_F y *wssF*_R; la reacción 6 con *wssF*_F y *wssG*_R; la reacción 7 con *wssG*1_F y *wssG*1_R; la reacción 8 con *wssB*_F y 1029_R; la reacción 9 con *wssE*_F y *wssG*_R; la reacción 10 con *wssF*_F y *wssG*1_R; la reacción 11 con *wssE*_F y *wssG*1_R. D, PCR control con ADN cromosómico; R, RT-PCR sobre ARN total. Se indican los tamaños en pb de distintas bandas de los marcadores de peso molecular (VIII y X de Roche).

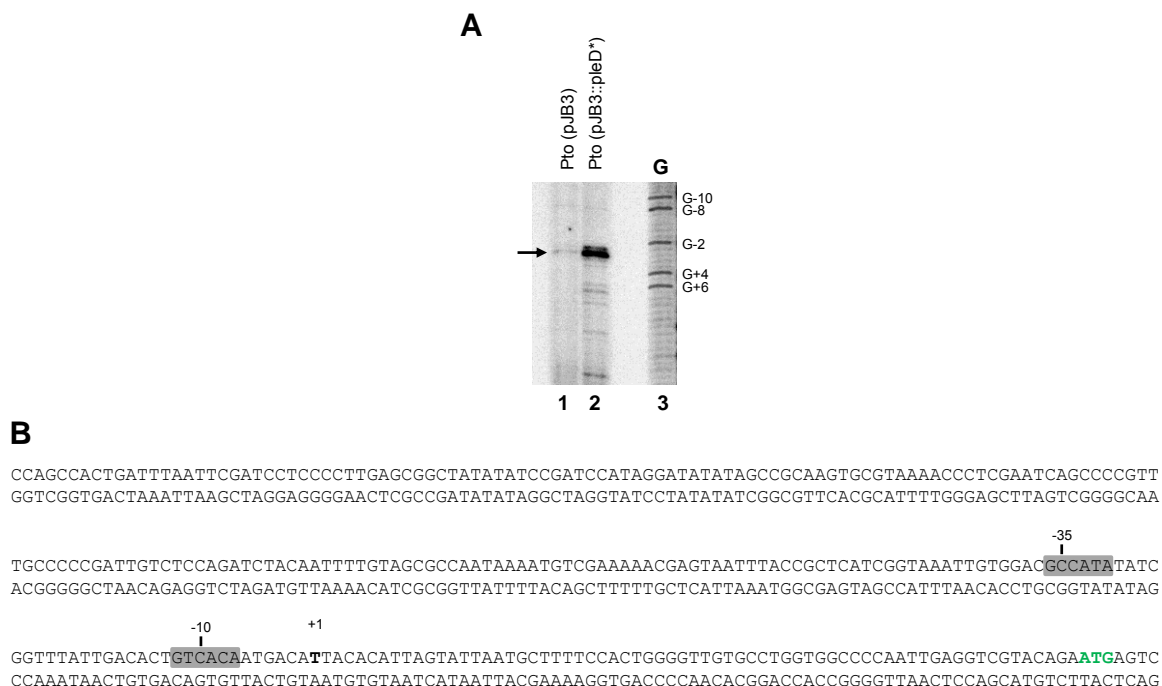


Figura 35. Determinación del punto de inicio de la transcripción del operón *wss* mediante ensayos de extensión reversa a partir de un cebador.

A. 20 µg de ARN total de las cepas Pto DC3000 (pJB3Tc19) (calle 1) y Pto DC3000 (pJB3pleD*) (calle 2) obtenido de cultivos en MMR a una $DO_{660}=0,5$ se utilizaron en las reacciones de transcripción reversa para generar los correspondientes ADNc, como se describe en la sección 4.4 de Materiales y Métodos. La calle 3 contiene el producto de una reacción de secuenciación con DMS (las bandas corresponden a las G) realizada sobre un fragmento de PCR marcado con el mismo cebador utilizado en la transcripción reversa. La flecha situada a la izquierda indica el producto de ADNc obtenido.

B. Secuencia de nucleótidos de la región 5' del operón *wss*. Las posiciones -10 y -35 de P_{wss} están indicadas, el punto de inicio +1 (en negrita) y el sentido de la transcripción están marcados con una punta de flecha; también se muestra el codón de iniciación (en verde) de *wssA*.

2. Papel de AmrZ en la regulación de la síntesis de celulosa

Tal y como se indica en el capítulo III, el mutante Pto/*fliC* 1847:Tn5 obtenido en la mutagénesis generalizada, producía más celulosa que la cepa parental, tanto en ausencia como en presencia de *pleD**, generando colonias rugosas, secas y rojas en placas de CR (CR⁺⁺) similares a las *rdar*, *RSCV* o *WS* de *Salmonella* y *Pseudomonas* (Römling *et al.*, 2002; Spiers *et al.*, 2002, 2003; Friedman y Kolter, 2004; Römling, 2005; Kader *et al.*, 2006; Whitney y Howell, 2013). PSPTO_1847 aparece anotado en el genoma de Pto como un represor transcripcional.

A pesar de los numerosos trabajos sobre este regulador, hasta la fecha no se ha demostrado que AmrZ regule la producción de celulosa en ninguna bacteria. Es conveniente mencionar que, a diferencia de Pto, *P. aeruginosa*, donde se han llevado a cabo la mayoría de los estudios, no posee los genes para la síntesis de celulosa. Sin embargo, en esta bacteria se ha demostrado que AmrZ tiene un papel dual en la regulación de otros EPS: por una parte, AmrZ actúa como activador transcripcional en la producción de alginato y, por otra, reprime la expresión del operón *psl*, un polisacárido rico en manosa y galactosa que es

esencial para la formación de biopelículas (Baynham *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2013). Por tanto, teniendo en cuenta la alta homología, la función reguladora de AmrZ sobre diversos EPS en otras bacterias y los fenotipos CR y CF obtenidos con el mutante Pto/*fliC* 1847:Tn5, nos propusimos estudiar el papel de AmrZ en la regulación de la biosíntesis de celulosa en Pto.

2.1. Construcción de un mutante dirigido en *amrZ*

En el mutante PSPTO_1847:Tn5 la inserción del transposón se localizó 29 pb aguas abajo del ORF (ver apartado 1.2. del Capítulo III), por lo que su fenotipo podría deberse tanto a la pérdida como a la ganancia de función del producto génico codificado por PSPTO_1847. Para dilucidar este aspecto se obtuvo un mutante dirigido en este gen mediante la inserción de un casete con resistencia a gentamicina (Gm). En primer lugar, se clonó una región que incluía el ORF así como sus regiones adyacentes en el plásmido pBluescript, que no replica en *Pseudomonas*, y posteriormente se insertó un casete de Gm en un sitio *SphI* interno del gen (Figura 36). En la sección Materiales y Métodos se describe con detalle cómo se generó el plásmido pBluescript::*amrZ*-Gm (apartado 1.2.2) y cómo se llevó a cabo el reemplazamiento génico en la cepa Pto DC3000 (apartado 2.5.5). Se analizaron mediante PCR diferentes clones Gm^r utilizando oligonucleótidos que hibridaban con las regiones flanqueantes a PSPTO_1847 (Figura 36).

2.2. Caracterización del mutante Pto *amrZ*

Una vez construido el mutante dirigido en PSPTO_1847 (Pto *amrZ*), se le introdujeron por electroporación los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD* y se llevó a cabo su caracterización en condiciones de bajos y altos niveles intracelulares de c-di-GMP, con el propósito de confirmar los fenotipos previamente observados con el mutante Pto/*fliC* 1847:Tn5.

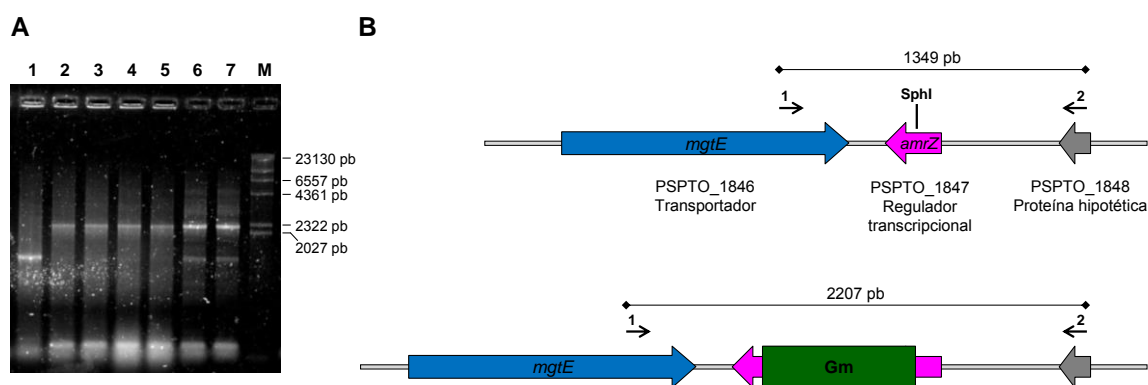


Figura 36. Comprobación del mutante *amrZ* construido mediante doble recombinación en Pto DC3000.

A. Gel con las PCRs comprobatorias de colonias de la cepa silvestre (calle 1) y de posibles mutantes en el gen PSPTO_1847 (calles 2-7). A la derecha se indica el tamaño en pb del marcador de peso molecular (M, marcador II de Roche).

B. El esquema muestra el punto de inserción del casete de Gm en el único sitio *SphI* dentro de PSPTO_1847. Se indican los oligos utilizados para las PCRs (1, HindIII_1847 y 2, R_1847) y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *amrZ*.

2.2.1. Producción de exopolisacáridos

En primer lugar, se estudió el fenotipo del mutante Pto *amrZ* en placas con CR y CF, observándose que en presencia de PleD*, produce colonias más rojas en placas con CR y más fluorescentes bajo luz ultravioleta en placas suplementadas con CF que la cepa silvestre (Figura 37). Este fenotipo es similar al observado en el mutante Pto *fliC/1847:Tn5* (pJBpleD*) (ver capítulo III, apartado 1.2.2).

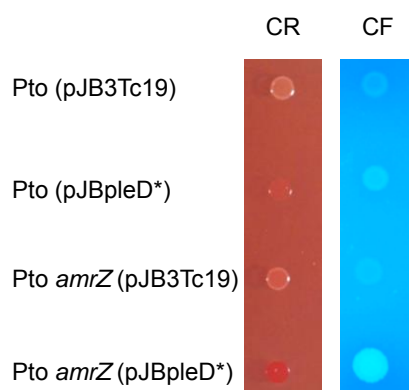


Figura 37. Aspecto de las colonias de Pto y Pto *amrZ* en presencia y ausencia de PleD*. 2 μ l de una suspensión bacteriana de las cepas Pto (pJB3Tc19), Pto (pJBpleD*), Pto *amrZ* (pJB3Tc19) y Pto *amrZ* (pJBpleD*) ajustada a una $DO_{660}=2,0$ en $MgCl_2$, se depositaron en la superficie de placas de LB con CR (50 μ g/ml, izquierda) o CF (200 μ g/ml, derecha) y tetraciclina (10 μ g/ml) y se incubaron 48 h a 20°C.

Además, la determinación cuantitativa de celulosa mediante su unión a CF en medio líquido, indica que la pérdida de *amrZ* provoca un incremento en la producción de este polímero en ausencia de *pleD** (Figura 38). A diferencia de lo que ocurre en LB (Figura 37), en el medio mínimo MMR en presencia de PleD* no se detectaron diferencias significativas, debido probablemente a que en este medio y en las condiciones ensayadas, la producción de celulosa es máxima (ver capítulo II, apartado 2.2).

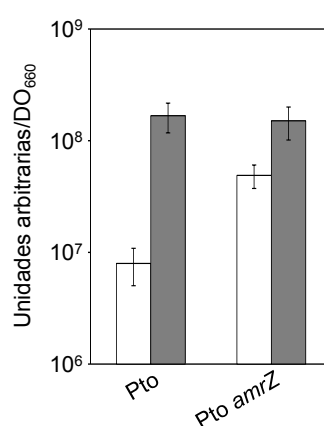


Figura 38. Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos bacterianos de Pto y Pto *amrZ* en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Pto y Pto *amrZ* con pJB3Tc19 (blanco) o pJBpleD* (gris) se cultivaron en MMR con CF (100 μ M) durante 24 h a 20°C para posteriormente medir la emisión de fluorescencia del CF unido a las diferentes cepas (ver apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se expresa la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por unidad de absorbancia del cultivo a 660 nm (DO_{660}). Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas de al menos 3 muestras independientes.

Estos resultados indican que AmrZ está regulando negativamente la producción de celulosa en Pto. Se debe mencionar aquí que dicha función represora de AmrZ sobre el operón de la celulosa ha sido sugerida, aunque no demostrada, en *P. fluorescens* SBW25 (Giddens *et al.*, 2007).

2.2.2. Motilidad

Dado que AmrZ regula la motilidad en otras bacterias, se realizaron ensayos de motilidad *swimming* y *swarming* con Pto y Pto *amrZ* para determinar si también contribuía a este fenotipo en Pto. Asimismo, se construyó un plásmido con una copia silvestre del gen, pBBR1-MSC2::*amrZ* (ver apartado 1.2.2. de Materiales y Métodos), que se electroporó en el mutante *amrZ* para complementar la mutación en estos ensayos. También se construyeron las correspondientes cepas control electroporando Pto y Pto *amrZ* con el vector vacío (pBBR1-MCS2).

El mutante Pto *amrZ* presentó una disminución en motilidad, tanto *swimming* como *swarming*, con respecto a la cepa parental. Este efecto positivo de *amrZ* sobre la motilidad se confirmó mediante la complementación con la copia silvestre en *trans*, que restauró el fenotipo silvestre (Figura 39). Curiosamente, el comportamiento del mutante Pto *amrZ* es contrario al observado en otras bacterias del género, como *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* F113, cuyos mutantes *amrZ* son más móviles que las respectivas cepas parentales. En esas cepas, AmrZ actúa como represor transcripcional de *fleQ*, que codifica el regulador maestro de los genes flagelares (Tart *et al.*, 2006; Martínez-Granero *et al.*, 2012).

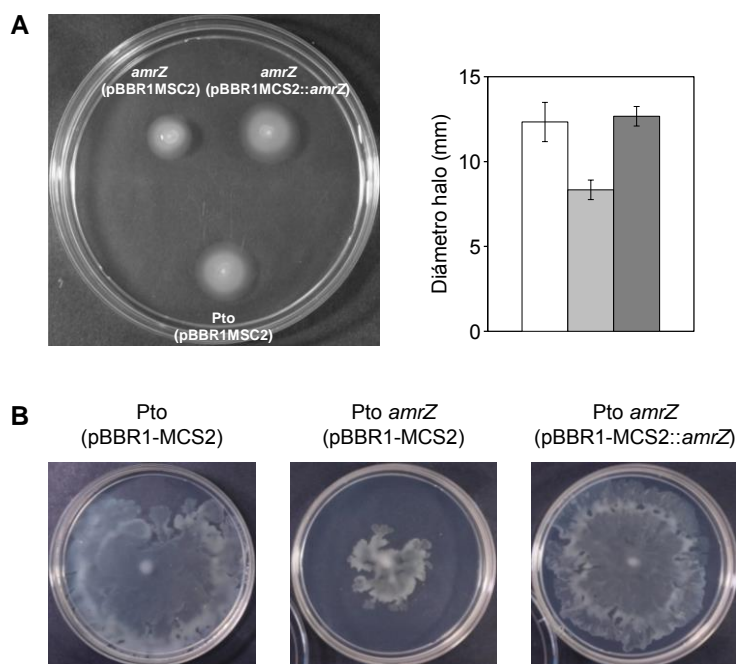


Figura 39. Ensayos de motilidad con Pto, el mutante *amrZ* y su complementante.

A. Motilidad tipo *swimming*. 2 μ l de suspensiones bacterianas de las cepas Pto (pBBR1-MCS2), Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2) y Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2::*amrZ*) ajustadas a $DO_{660}=2,0$ se pincharon en el centro de placas de LB (0,3% agar) y se incubaron 48 h a 25°C, tras lo cual se tomaron las fotos y se midieron los halos de *swimming*. En la gráfica se muestran las medidas del diámetro del halo producido por Pto (pBBR1-MCS2) en blanco, Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2) en gris claro y Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2::*amrZ*) en gris oscuro.

B. Motilidad tipo *swarming*. 2 μ l de suspensiones bacterianas de las cepas Pto (pBBR1-MCS2), Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2) y Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2::*amrZ*) ajustadas a $DO_{660}=2,0$ se depositaron en la superficie de placas de PG-agar (0,5% agar) y se incubaron 24 h a 25°C.

La disminución de la motilidad tanto *swimming* como *swarming* en el mutante Pto *amrZ* indica que AmrZ podría estar actuando, directa o indirectamente, como un regulador positivo de la biogénesis del flagelo en Pto. En soporte con esta idea, estudios de transcriptómica realizados en nuestro laboratorio mostraron una disminución de la transcripción de *fliC*, pero no de *fleQ*, en el mutante *amrZ* con respecto a la cepa silvestre (Figura 40). Además, se observó que, efectivamente, el mutante poseía un menor número de flagelos que la cepa parental (Figura 41). Estos resultados, de nuevo, son contrarios a los obtenidos en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* F113, donde se observa un incremento en la transcripción de *fliC* en sendos mutantes *amrZ* (Martínez-Granero *et al.*, 2012).

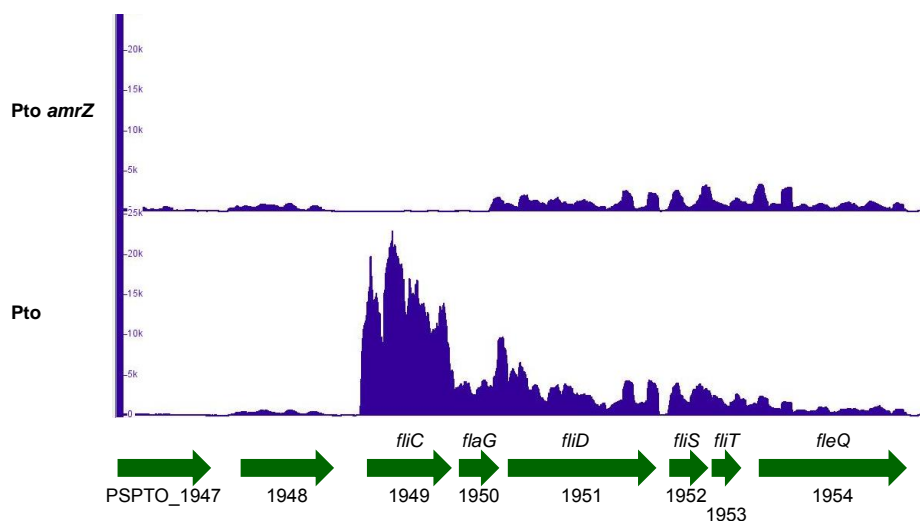


Figura 40. Niveles de ARNm de *fliC* y genes adyacentes. Las cepas Pto (pJB3Tc19) y Pto *amrZ* (pJB3Tc19) se cultivaron en MMR con Tc (10 µg/ml) a 20°C hasta una DO_{660} de 1, momento en que se realizó la extracción del ARN según lo descrito en Materiales y métodos (apartado 4.1). Los niveles de transcritos se obtuvieron tras secuenciación masiva del cDNA total (IlluminaHiSeq 2000, Macrogen) y procesamiento de las lecturas. En la gráfica se muestra la cobertura (número de lecturas) de la región de *fliC* en las dos librerías de cDNA sometidas a RNA-seq visualizadas con IGB.

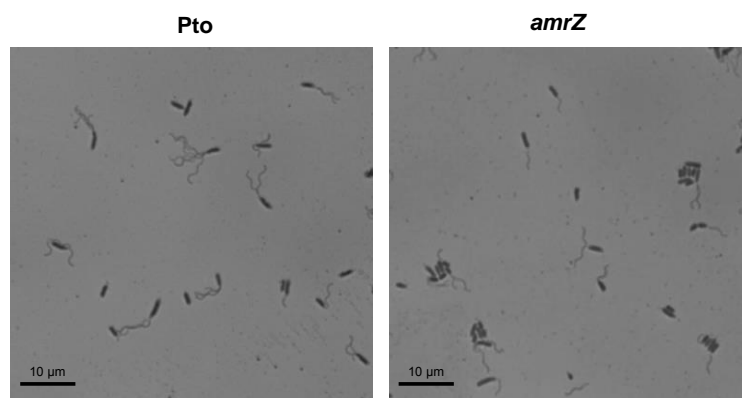


Figura 41. Visualización de la abundancia flagelar en células de Pto y Pto *amrZ*. Las cepas se resuspendieron a partir de placas de PG-agar en $MgCl_2$ 10 mM y se ajustaron a $DO_{660}=1,0$ y posteriormente se tiñeron los flagelos según el protocolo de Clark (1976) para su observación en el microscopio óptico (ver apartado 9.1 de Materiales y métodos).

Aparte de lo descrito anteriormente, hay que tener en cuenta que el incremento en la producción de celulosa en el mutante Pto *amrZ* podría tener un efecto negativo sobre su motilidad de una forma indirecta, ya que, tal y como se ha descrito en *Salmonella*, la producción de celulosa *per se* puede impedir la adecuada rotación flagelar (Zorraquino *et al.*, 2012).

2.3. Papel de AmrZ en la regulación del operón de síntesis de celulosa

Teniendo en cuenta que AmrZ posee un dominio de unión a ADN y su papel como regulador transcripcional de los genes de motilidad y de producción de EPS en otras bacterias (Baynham *et al.*, 2006; Tart *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2013), era plausible que AmrZ estuviera regulando la producción de celulosa en Pto, reprimiendo la expresión del operón *wss*. Con el fin de analizar si AmrZ controla la expresión del operón de síntesis de la celulosa *wssABCDEFGHI*, se analizó la expresión del gen *wssB* en las cepas Pto y Pto *amrZ* mediante qRT-PCR, tanto en ausencia como en presencia de *pleD**.

En Pto se observa que los niveles de expresión de *wssB* eran bajos en ausencia de PleD* pero incrementaron unas 25 veces en su presencia (Figura 42). Esto concuerda con lo observado en los ensayos de extensión reversa, donde se obtuvo mayor cantidad de cDNA correspondiente al mRNA del operón *wss* en la cepa portadora del plásmido pJB3pleD* que en la cepa con pJB3Tc19 (Figura 35) e indica que los altos niveles de c-di-GMP inducen la transcripción de este operón. En el mutante Pto *amrZ* los niveles de ARNm de *wssB* son mayores que los de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de PleD* (Figura 42). Estos resultados muestran que AmrZ reprime la expresión del operón *wssABCDEFGHI*. Sin embargo, en ausencia de PleD* el mutante Pto *amrZ* no alcanza los niveles de transcripción observados en la cepa silvestre sobreexpresando *pleD**, lo que sugiere la presencia de otro regulador que sí parece responder a los altos niveles de c-di-GMP potenciando la transcripción del operón (Figura 42).

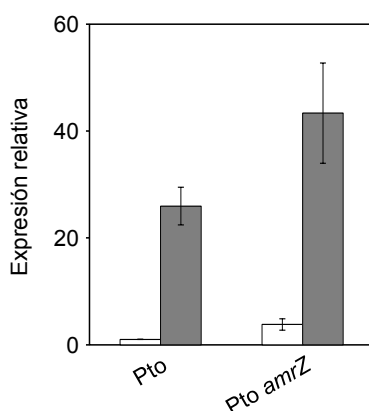


Figura 42. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión relativa de *wssB* en Pto y Pto *amrZ*. Las cepas Pto y Pto *amrZ* en ausencia (blanco) y en presencia (gris) de *pleD** se cultivaron en MMR durante 24 h a 20°C en agitación, tras lo cual se extrajo el ARN total. La expresión se normalizó con el gen *gyrA*. Las medidas corresponden a la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas con sus desviaciones típicas.

Con el propósito de determinar si el efecto represor de AmrZ sobre la transcripción del operón de síntesis de la celulosa era directo, se llevaron a cabo ensayos de unión a la región promotora del operón *wss* mediante ChIP-seq (*Chromatin immunoprecipitation*). Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Rafael Rivilla de la Universidad Autónoma de Madrid.

La alta similitud de secuencia aminoacídica entre AmrZ de *P. fluorescens* F113 y Pto (85% de identidad y 93% de similitud), permitía la utilización de construcciones ya disponibles en el grupo del Dr. Rafael Rivilla para llevar a cabo los ensayos de unión a la región promotora del operón *wss* de Pto. Se utilizaron dos plásmidos que codificaban la proteína AmrZ de *P. fluorescens* F113 marcada con una hemaglutinina en el extremo N- o C-terminal (pVL33::HA-*amrZ* y pVL33::*amrZ*-HA, respectivamente) y el plásmido pVL33 vacío como control (Martínez-Granero *et al.*, 2014). En primer lugar, se realizaron unos ensayos preliminares para evaluar si la proteína AmrZ de *P. fluorescens* F113 era funcionalmente intercambiable con la de Pto; es decir, si era capaz de complementar la deficiencia del mutante Pto *amrZ* en el fenotipo de producción de celulosa. Para ello, se introdujeron en el mutante Pto *amrZ* las construcciones pVL33::HA-*amrZ*, pVL33::*amrZ*-HA y el plásmido vacío (pVL33) y se comparó la producción de celulosa de dichas cepas con la de la cepa silvestre y con el mutante Pto *amrZ* complementado con las diferentes construcciones (Figura 43). La complementación de la mutación *amrZ* de Pto con una copia en *trans*, tanto homóloga (pBBR1-MCS2::*amrZ*) como heteróloga (pVL33::*amrZ*-HA), permitió la recuperación del fenotipo parental, con unos valores de producción de celulosa similares a los obtenidos con la cepa silvestre (Figura 43). Se debe mencionar que la construcción pVL33::HA-*amrZ* no fue capaz de complementar el mutante Pto *amrZ*, indicando que la presencia de la hemaglutinina en el extremo N-terminal de AmrZ impide el correcto funcionamiento de la proteína. Por tanto, se utilizó la construcción pVL33::*amrZ*-HA en los experimentos de inmunoprecipitación.

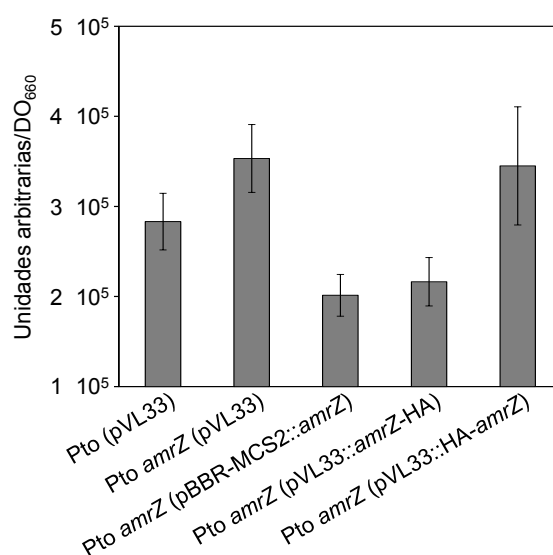


Figura 43. Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos bacterianos de Pto y Pto *amrZ*. Pto (pVL33), Pto *amrZ* (pVL33), Pto *amrZ* (pBBR1-MCS2::*amrZ*), Pto *amrZ* (pVL33::*amrZ*-HA) y Pto *amrZ* (pVL33::HA-*amrZ*) se cultivaron en MMR durante 24 h a 20°C. Posteriormente, se tiñeron con CF (100 μM) y se midió la emisión de fluorescencia del CF unido a las diferentes cepas (ver apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se expresa la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por unidad de absorbancia del cultivo a 660 nm (DO₆₆₀). Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas de al menos 3 muestras independientes.

Para llevar cabo los ensayos de inmunoprecipitación ChIP-seq se siguió el protocolo descrito por Lin *et al.* (2005). Así, a partir de cultivos líquidos de la cepa parental portadora de la fusión traduccional AmrZ-HA (pVL33::amrZ-HA), se inmunoprecipitó el ADN genómico con los anticuerpos anti-HA y anti-IgG (control negativo). El ADN inmunoprecipitado fue liberado y purificado de los respectivos anticuerpos, para posteriormente ser cuantificado por qPCR utilizando cebadores específicos que hibridan en las regiones promotoras de *wssA* y *amrZ*. Los resultados se normalizaron con el gen *gyrA*. Los datos obtenidos demuestran que AmrZ se une al promotor de su propio gen y también al promotor de *wssABCDEFghi*, pero no a *gyrA* (Figura 44).

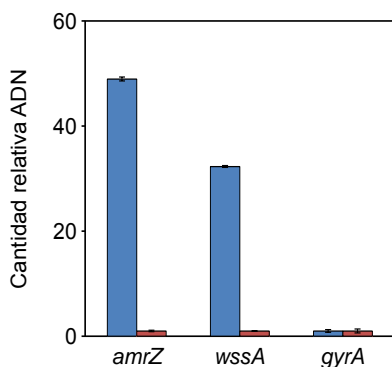


Figura 44. Unión de AmrZ a la región promotora de *amrZ*, *wssA* y *gyrA*. Pto *amrZ* (pVL33::amrZ-HA) se cultivó a 28°C en LB suplementado con kanamicina (25 µg/ml) e IPTG 1 mM (ver apartado 5.7 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestra la cantidad de ADN inmunoprecipitado con los anticuerpos anti-HA (azul) y anti-IgG (rojo) normalizada con el gen *gyrA*. Las medidas corresponden a la medida de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

El análisis ChIP-seq junto con estudios previos que habían identificado los sitios de unión de AmrZ (Baynham *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997; Baynham *et al.*, 1999; Ramsey *et al.*, 2005; Baynham *et al.*, 2006; Waligora *et al.*, 2010; Pryor *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013; Martínez-Granero *et al.*, 2014), ha permitido predecir sitios consenso de unión de AmrZ tras la identificación de secuencias comunes dentro los ADNs que aparecen enriquecidos, como *amrZ* y *wssA* (Figura 45).

En *amrZ* se pueden distinguir dos motivos de 13 nucleótidos, uno que solapa con la putativa región -35 del promotor y otro que está situado dentro de la secuencia codificante de *amrZ*. En *wssA* se observa un motivo que solapa, no solo con la región -10 de su promotor, sino también con el punto de inicio de la transcripción. Este posible operador de AmrZ se aparta un poco de la secuencia consenso pero contiene un palíndromo perfecto (TGTCN₅GACA) y su localización explicaría el efecto represor que ejerce esta proteína sobre la expresión del operón de síntesis de celulosa.

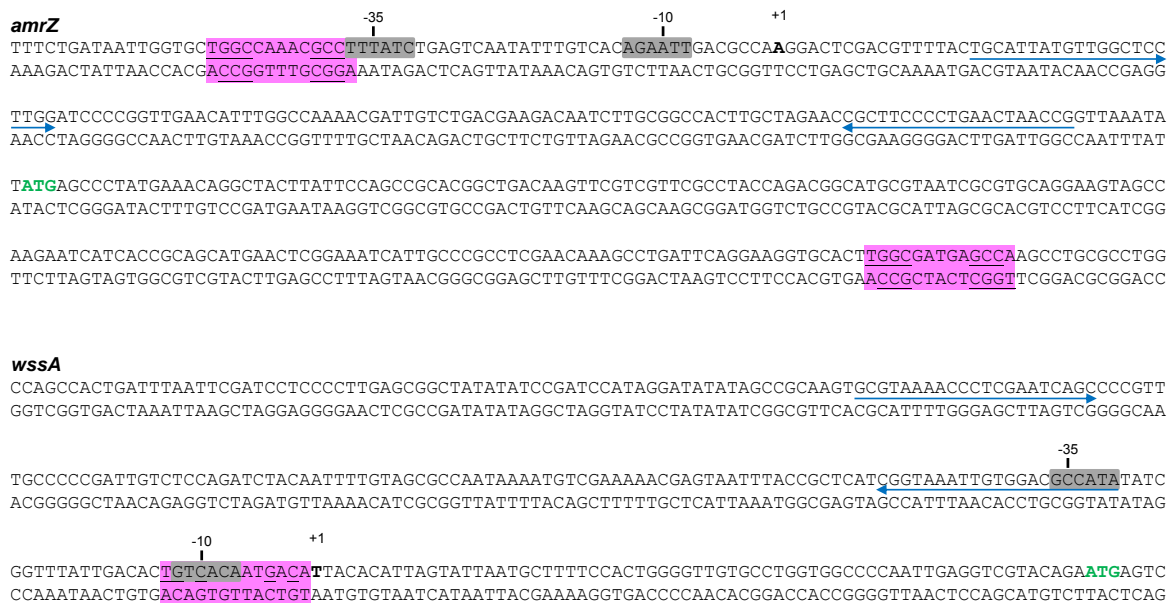


Figura 45. Posibles sitios de unión de AmrZ a los promotores de *amrZ* y *wssA*. Secuencia de nucleótidos de la región 5' de *amrZ* y del operón *wss*. Se indican las hipotéticas posiciones -10 y -35 de los promotores, el punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha); también se muestran los codones de iniciación (en verde) de *amrZ* y *wssA* y los oligos utilizados en el experimento de ChIP-seq para la detección de esos ADN (flechas en azul). En rosa se indican los posibles sitios de unión de AmrZ; los nucleótidos subrayados son los conservados con la secuencia consenso propuesta por Martínez-Granero *et al.* (2014).

2.4. Cuantificación de los niveles de c-di-GMP en el mutante Pto *amrZ*

Los resultados hasta ahora obtenidos ponen de manifiesto un papel clave del regulador transcripcional AmrZ en la producción de celulosa de Pto mediante su unión al promotor del operón *wssABCDEFGHI*. Sin embargo, recientemente se ha descrito que AmrZ también puede controlar la síntesis de otros EPS de forma indirecta, alterando los niveles de c-di-GMP necesarios para su síntesis. Esto es lo que ocurre en *P. aeruginosa*, donde AmrZ reprime la expresión de la DGC AdcA, responsable de la producción del c-di-GMP necesario para la síntesis de Psl y Pel (Jones *et al.*, 2014). Igualmente, AmrZ podría regular los niveles de c-di-GMP necesarios para la activación alostérica de la celulosa sintasa en Pto, reprimiendo la expresión de una DGC o induciendo la expresión de una PDE.

Con el propósito de comprobar si, además de reprimir la transcripción del operón de síntesis de celulosa, AmrZ podía estar alterando indirectamente los niveles intracelulares de c-di-GMP en Pto, se midieron dichos niveles en el mutante *amrZ* en comparación con la cepa silvestre mediante HPLC-MS. No se detectaron diferencias significativas entre el mutante Pto *amrZ* y la cepa silvestre en las condiciones ensayadas, lo que sugiere que AmrZ no tiene un impacto considerable sobre los niveles generales de c-di-GMP en Pto (Figura 46). No obstante, dada la baja sensibilidad de la técnica empleada para la cuantificación, no podemos afirmar con rotundidad que AmrZ no esté alterando los niveles de este segundo mensajero mediante la regulación de alguna(s) DGC y/o PDE, ya que ese c-di-GMP podría estar

activando alostéricamente a la celulosa sintasa (WssB) de forma específica, sin afectar los niveles celulares globales de c-di-GMP en Pto.

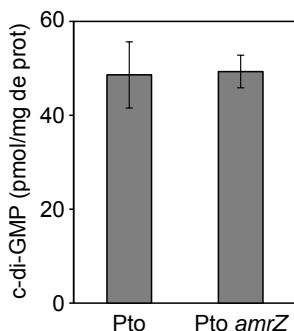


Figura 46. Cuantificación de los niveles de c-di-GMP mediante HPLC-MS. Pto y Pto *amrZ* se cultivaron en LB durante 24 h, momento en el que se procesaron los cultivos según lo descrito por Amikam *et al.* (1995) (ver apartados 8.1 y 8.2 de Materiales y Métodos). Se expresan las cantidades de c-di-GMP (picomoles) por mg de proteína total. Las barras indican la desviación estándar de las medidas de 3 réplicas biológicas.

3. Papel de FleQ en la regulación de la síntesis de celulosa

Tal y como se indicó en el apartado 2.3 de este capítulo, los ensayos de expresión del operón *wss* sugieren la presencia de otro regulador que, a diferencia de AmrZ, parece responder a los altos niveles de c-di-GMP y activar la transcripción de dicho operón (Figura 42). En ese sentido, FleQ se ha descrito como el regulador maestro de la biogénesis flagelar en *Pseudomonas* donde, además de la motilidad, controla la síntesis de diferentes EPS en respuesta al c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012; Martínez-Gil *et al.*, 2014). Sin embargo y a pesar de los numerosos trabajos sobre este regulador, hasta la fecha no se ha establecido que FleQ regule la síntesis de celulosa en ninguna bacteria. Es conveniente remarcar que *P. aeruginosa*, donde se han realizado la mayoría de dichos estudios, no posee genes para la síntesis de este biopolímero y que en esta bacteria sí se ha demostrado que FleQ une de manera específica c-di-GMP regulando la expresión de los EPS Pel y Psl (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012). Por tanto, teniendo en cuenta la alta homología y la acción reguladora de FleQ sobre la producción de diversos EPS en respuesta al c-di-GMP, nos planteamos estudiar el papel de FleQ en la regulación del operón de síntesis de la celulosa en Pto.

3.1. Construcción de un mutante Pto *fleQ*

Se construyó un mutante dirigido mediante la inserción de un interposón con resistencia a kanamicina en el gen *fleQ*. Para ello, se construyó un derivado del plásmido pUC18, que no replica en *Pseudomonas*, clonando una región que incluía las secuencias adyacentes a *fleQ* (PSPTO_1954) y, posteriormente, se insertó un interposón Ω Km (Fellay *et al.*, 1987) en un sitio NaeI interno (Figura 47). En la sección de Materiales y Métodos se describe con detalle cómo se generó el plásmido pUC18::*fleQ* Ω Km (apartado 1.2.2) y cómo se llevó a cabo el reemplazamiento génico en la cepa Pto DC3000 (apartado 2.5.5). Tras

obtener diferentes clones Km^r estos se analizaron mediante PCR utilizando oligonucleótidos que hibridaban con las regiones flanqueantes a *fleQ* (Figura 47).

3.2. Caracterización del mutante Pto *fleQ*

Una vez construido el mutante dirigido en el gen *fleQ*, se llevó a cabo su caracterización, en condiciones basales y en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Para ello, en primer lugar, se le introdujeron por electroporación los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD* para posteriormente analizar su comportamiento en motilidad, fenotipo en placas de CR y CF, determinar la expresión del operón *wss* y la producción de celulosa.

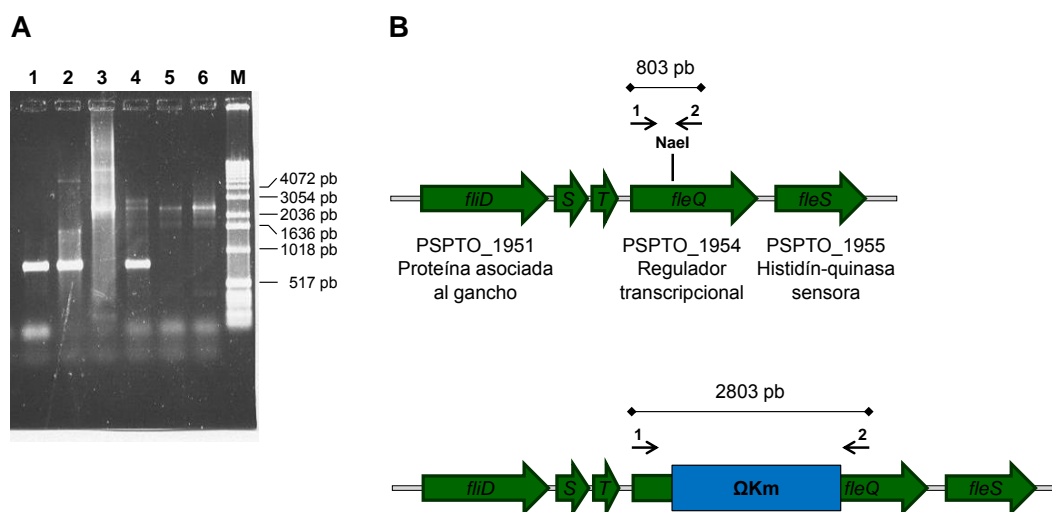


Figura 47. Comprobación del mutante *fleQ* construido mediante doble recombinación en Pto DC3000.

A. Gel con las PCRs comprobatorias de colonias de la cepa silvestre (calle 1), un cointegrado (calle 4) y dos mutantes en el gen *fleQ* (calles 5 y 6). Como controles se utilizaron los plásmidos pUC18::*fleQ* (calle 2) y pUC18::*fleQΩKm* (calle 3). A la derecha se indica el tamaño en pb del marcador de peso molecular (M, marcador X de Roche).

B. El esquema muestra el punto de inserción del interposón de Km en el único sitio *NaeI* dentro del gen PSPTO_1954. Se indican los oligos utilizados para las PCRs (1, *FleQ-F* y 2, *FleQ-R*) y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *fleQ*.

3.2.1. Motilidad

Dado que *FleQ* es el regulador maestro para la síntesis de los flagelos en otras *Pseudomonas*, se realizaron ensayos de motilidad tipo *swimming* y *swarming* con el mutante para estudiar su comportamiento. Para complementar el mutante Pto *fleQ* se construyó un plásmido de amplio rango de hospedador y bajo número de copias que portaba una copia silvestre del gen *fleQ* (pJB3::*fleQ*) (ver apartado 1.2.2. de Materiales y Métodos). Asimismo, tanto Pto DC3000 como el mutante Pto *fleQ*, se electroporaron con el plásmido vacío (pJB3Tc19) para construir los respectivas cepas control.

En los ensayos de motilidad tipo *swimming* y a diferencia de la cepa silvestre, Pto *fleQ* no se movió del punto de inoculación (Figura 48A), lo que concuerda con el hecho de que un mutante Pto *fleQ* carece de flagelos (P. Vargas y M.T. Gallegos, resultados no publicados). Sin embargo, en los ensayos de motilidad tipo *swarming*, Pto *fleQ* presentó un movimiento estrellado, diferente al observado en la cepa parental

(Figura 48B). Este movimiento en superficie, en sentido estricto, no se debe denominar *swarming* ya que, por definición, es un movimiento dependiente de flagelos (Kearns, 2010). Por lo tanto y mientras no se caracterice más detalladamente, debe ser considerado un movimiento en superficie no dependiente de flagelos. La complementación en *trans* con la copia silvestre del gen *fleQ* revirtió al fenotipo silvestre en motilidad, tanto *swimming* como en superficie (Figura 48).

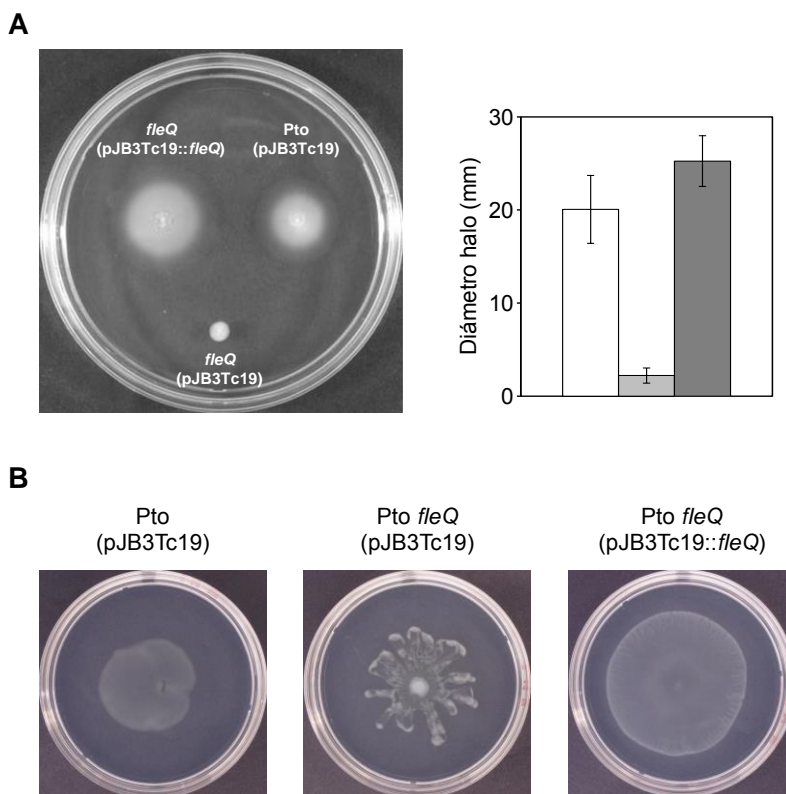


Figura 48. Ensayos de motilidad con Pto, el mutante *fleQ* y su complementante.

A. Motilidad tipo *swimming*. 2 μ l de una suspensión bacteriana de las cepas Pto (pJB3Tc19), Pto *fleQ* (pJB3Tc19) y Pto *fleQ* (pJB3::*fleQ*) ajustada a una $DO_{660}=2,0$ se pincharon en el centro de placas de LB (0,3% agar) y se incubaron durante 48 h a 25°C, tras lo cual se tomaron las fotos y se midieron los halos de *swimming*. En la figura se observan las medidas del diámetro del halo a las 48 h producido por Pto (pJB3Tc19) en blanco, Pto *fleQ* (pJB3Tc19) en gris claro y Pto *fleQ* (pJB3::*fleQ*) en gris oscuro.

B. Movimiento en superficie. 2 μ l de una suspensión bacteriana de las cepas Pto (pJB3Tc19), Pto *fleQ* (pJB3Tc19) y Pto *fleQ* (pJB3::*fleQ*) ajustada a una $DO_{660}=2,0$ se depositaron en la superficie de placas de PG-agar (0,5% agar) y se incubaron durante 24 h a 25°C.

3.2.2. Producción de exopolisacáridos

Se estudió el fenotipo del mutante Pto *fleQ* en placas con CR y CF, en presencia y ausencia de PleD* (Figura 49). Así, en ausencia de PleD*, Pto *fleQ* produce colonias semejantes a las observadas en la cepa silvestre con el plásmido vacío. Sin embargo, en presencia de PleD*, las colonias del mutante *fleQ* son menos rojas y fluorescentes que las de la cepa silvestre sobreexpresando *pleD** (Figura 49).

Con el propósito de confirmar las diferencias observadas en las placas con CR y CF, se determinó cuantitativamente la producción de celulosa por las cepas Pto y Pto *fleQ* en medio líquido. En primer lugar, se confirmó que no existen diferencias significativas en producción de celulosa entre Pto *fleQ* y la cepa

silvestre a niveles fisiológicos de c-di-GMP (Figura 50). Sin embargo, en presencia de PleD* el mutante *fleQ* incrementó levemente la producción de celulosa con respecto a la cepa con el plásmido vacío (pJB3Tc19), pero estos niveles eran significativamente inferiores a los medidos en la cepa silvestre sobreexpresando *pleD** (Figura 49). Estos resultados sugieren que FleQ está implicado en la regulación de la síntesis de celulosa en Pto y es necesario para su producción máxima en condiciones de altos niveles de c-di-GMP. Dicha regulación *a priori* podría ocurrir directamente, regulando la expresión del operón *wss* y/o indirectamente, regulando otros genes implicados en la producción de celulosa.

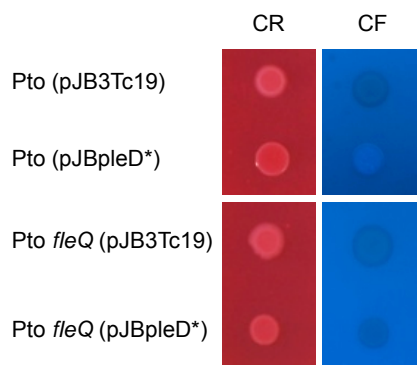


Figura 49. Aspecto de las colonias de Pto y Pto *fleQ* en presencia y ausencia de PleD*. 2 µl de una suspensión bacteriana de las cepas Pto (pJB3Tc19), Pto (pJBpleD*), Pto *fleQ* (pJB3Tc19) y Pto *fleQ* (pJBpleD*) ajustada a $DO_{660}=2,0$ en $MgCl_2$, se depositaron en la superficie de placas de LB con CR (50 µg/ml, izquierda) o CF (200 µg/ml, derecha) suplementadas con tetraciclina (10 µg/ml) y se incubaron a 20°C durante 48 h.

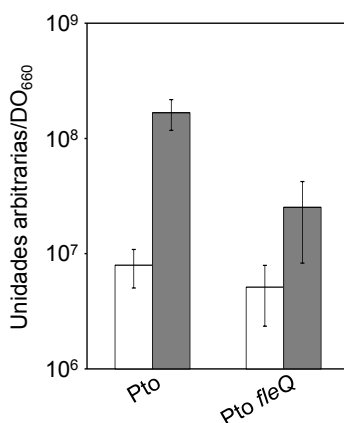


Figura 50. Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos bacterianos de Pto y Pto *fleQ* en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Pto y Pto *fleQ* con pJB3Tc19 (blanco) o pJBpleD* (gris) se cultivaron en MMR con CF (100 µM) durante 24 h a 20°C para posteriormente medir la emisión de fluorescencia del CF unido a las diferentes cepas (ver apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se expresa la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por unidad de absorbancia del cultivo a 660 nm (DO_{660}). Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas de al menos 3 muestras independientes.

3.3. Papel de FleQ en la regulación del operón de síntesis de la celulosa

Con el fin de analizar si FleQ ejerce su efecto sobre la expresión del operón *wss* a nivel transcripcional, se analizó la expresión del gen *wssB* en las cepas Pto y Pto *fleQ* mediante qRT-PCR, tanto en ausencia como en presencia de *pleD**.

En ausencia de *PleD**, los niveles de ARNm de *wssB* en el mutante Pto *fleQ* son superiores a los de la cepa silvestre (Figura 51), lo que indica que, al igual que AmrZ, FleQ reprime (directa o indirectamente) la expresión del operón *wss*. Por otro lado, la expresión de *wssB* no varió significativamente en presencia de *PleD** en el mutante Pto *fleQ* y no alcanzó los niveles observados en la cepa silvestre sobreexpresando *pleD**. Estos resultados sugieren que la presencia de FleQ es necesaria para inducir la transcripción del operón *wss* en presencia de altos niveles de c-di-GMP (Figura 51).

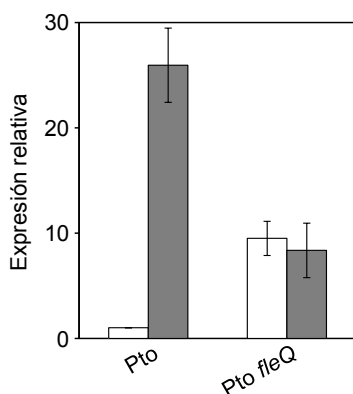


Figura 51. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión relativa de *wssB* en las cepas Pto y Pto *fleQ*. Las cepas Pto y Pto *fleQ* en ausencia (blanco) y en presencia (gris) de *pleD** se cultivaron en MMR durante 24 h a 20°C en agitación, tras lo cual se extrajo el ARN total. La expresión se normalizó con el gen *gyrA*. Las medidas corresponden a la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas con sus desviaciones típicas.

Con el fin de comprobar si FleQ se unía directamente al operón *wssABCDEFGHI* regulando su expresión, se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel con la proteína purificada. La producción controlada de FleQ se realizó en la cepa *E. coli* B834 (DE3) previamente transformada con el plásmido pTYB12::*fleQ*, a partir de la fracción soluble de los extractos celulares, obteniéndose la proteína FleQ nativa. En los ensayos de retardo se utilizaron diferentes fragmentos de ADN marcado (Figura 52 y 53) del operón *wss*. Como control positivo se utilizó un fragmento del promotor de *fleSR* de Pto DC3000, similar a otros en los que previamente se había demostrado la unión de FleQ en *P. aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2002; Hickman y Harwood, 2008).

Inicialmente, se establecieron las condiciones óptimas para la unión de FleQ a su ADN diana (*fleS*) *in vitro*: 1 μM de proteína, 1 nM de ADN e incubación en hielo durante 30 min. En los ensayos de retardo en gel únicamente se detectó la unión de FleQ a los fragmentos de ADN que contenían los promotores de *fleSR* y *wssA* (concretamente a *wssA1* y *wssA1-2*), pero no a otros fragmentos del operón *wss* (Figura 52 y resultados no mostrados). Se observó una banda de ADN retardada únicamente en presencia de FleQ, lo que corresponde a un solo tipo de complejo FleQ/ADN. Cabe señalar también que solo la adición a la

mezcla de unión del mismo ADN competidor no marcado, y no un exceso de ADN inespecífico, alteró la formación de este complejo, lo que confirma que la unión observada es específica (no mostrado).

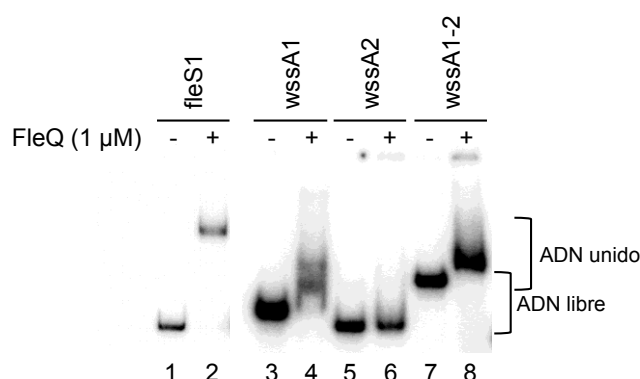


Figura 52. Unión específica *in vitro* de FleQ a diferentes fragmentos de ADN. Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos (sección 5.6). Varios fragmentos de ADN (1 nM) del promotor de *fleSR* (calles 1-4) y del operón *wss* (calles 5-12) se incubaron sin (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11) y con 1 μ M de FleQ nativa (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12) en 10 μ l de tampón de unión y en presencia de ADN inespecífico (poli dI-dC, 15 μ g/ml) y BSA (200 μ g/ml).

El análisis de las secuencias de los fragmentos retardados en el ensayo anterior junto con estudios previos que habían identificado los sitios de unión de FleQ (Jyot *et al.*, 2002; Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012), han permitido predecir los sitios de unión de FleQ, tanto en el promotor de *fleSR* como en el de *wssABCDEFGHI* (Figura 53). En el fragmento *fleS1* se puede apreciar la organización típica de un promotor dependiente de σ^{54} : las secuencias conservadas alrededor de -24 y -12, en lugar de las típicas cajas -35 y -10 reconocidas por el factor σ^{70} , un motivo conservado para la unión de FleQ (ATTGAC, entre -85 y -80) y un sitio putativo de unión de IHF (de -60 a -27) adyacente al promotor. En el promotor *fleSR* de *P. aeruginosa* FleQ funciona como activador transcripcional (EBP) de la σ^{54} -ARN polimerasa (Arora *et al.*, 1997) y este parece ser también el caso en Pto DC3000.

FleQ también se une al promotor de *wssABCDEFGHI* y, más concretamente, a los fragmentos *wssA1* (con menos afinidad) y *wssA1-2* (con mayor afinidad) (Figura 52). Los fragmentos *wssA1*, *wssA2* y *wssA1-2* poseen los mismos motivos pero difieren en tamaño, con 309, 323 y 458 pb, respectivamente (Figura 53), por lo que el diferente comportamiento de FleQ (se une con gran afinidad a *wssA1-2*, con menor afinidad a *wssA1* y no se une a *wssA2*) probablemente se deba a diferente estructura del ADN en cada fragmento y/o a la posición de los motivos. Por tanto, la estructura del ADN parece ser importante para la unión de FleQ, al menos cuando actúa como represor transcripcional.

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado demuestran que FleQ, al igual que AmrZ, actúa en Pto como un represor transcripcional del operón *wssABCDEFGHI* en ausencia de c-di-GMP. Sin embargo, en presencia de este segundo mensajero, FleQ es necesario para inducir la expresión del mismo (Figura 51). Este papel dual represor/activador de FleQ ya ha sido demostrado en otras bacterias como *P. aeruginosa*, donde FleQ activa o reprime la transcripción del operón *pel* dependiendo de la presencia o ausencia de c-di-GMP, respectivamente (Baraquet *et al.*, 2012).

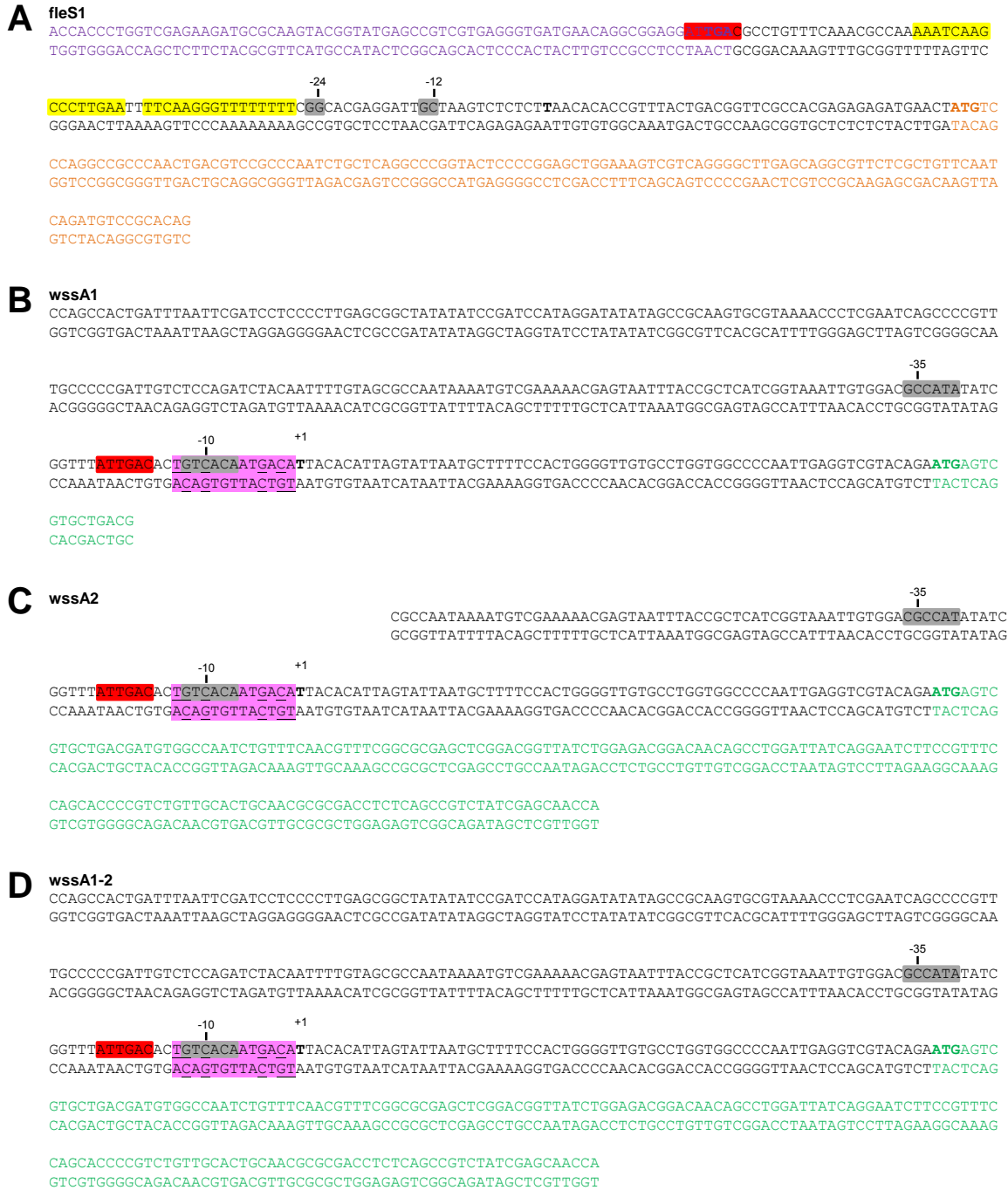


Figura 53. Secuencia de nucleótidos de los fragmento utilizados en los ensayos de retardo en gel.
A. Secuencia de fleS1. Se muestran las secuencias codificantes de *fleQ* (morado) y de *fleS* (naranja) y se indican las posiciones -12 y -24 del promotor de *fleSR*, el posible punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha). También se han resaltado los posibles sitios de unión de FleQ (rojo) y de IHF (amarillo).
B. Secuencia de wssA1. Se muestra la secuencia codificante de *wssA* (verde) y se indican las posiciones -10 y -35 del promotor de *wssABCDEFGH*, el punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha). También se han resaltado los posibles sitios de unión de FleQ (rojo) y de AmrZ (rosa).
C. Secuencia de wssA2. Se muestra la secuencia codificante de *wssA* (verde) y se indican las posiciones -10 y -35 del promotor de *wssABCDEFGH*, el punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha). También se han resaltado los posibles sitios de unión de FleQ (rojo) y de AmrZ (rosa).
D. Secuencia de wssA1-2. Se muestra la secuencia codificante de *wssA* (verde) y se indican las posiciones -10 y -35 del promotor de *wssABCDEFGH*, el punto de inicio (+1, en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha). También se han resaltado los posibles sitios de unión de FleQ (rojo) y de AmrZ (rosa).

4. Papel de AmrZ y FleQ en la regulación de la síntesis de celulosa

Con el propósito de avanzar en el estudio de la regulación de la producción de celulosa en Pto, se procedió a estudiar la expresión del operón *wss* y la producción de celulosa en un doble mutante *amrZ/fleQ*.

4.1. Construcción del doble mutante Pto *amrZ/fleQ*

Para la construcción del doble mutante, se utilizó el mutante Pto *fleQ* (ver apartado 3.1) al que se le incorporó por electroporación el plásmido pBluescript::*amrZ-Gm* para reemplazar la copia silvestre de *amrZ*. Tras la obtención de posibles clones mutantes Km^r y Gm^r , estos se analizaron mediante PCR, tal y como se describe en el apartado 2.1 de este capítulo.

4.2. Caracterización del doble mutante

A continuación, se llevó a cabo la caracterización del mutante Pto *amrZ/fleQ*, estudiando la expresión del operón *wss* y la producción de celulosa en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP, tras introducirle por electroporación los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD*.

4.2.1. Efecto de AmrZ y FleQ en la expresión del operón *wss*

Con el fin de investigar si la expresión del operón *wss* estaba co-reprimida por AmrZ y FleQ, se analizó la expresión de *wssB* en las cepas Pto y Pto *amrZ/fleQ* mediante qRT-PCR, observándose que sus niveles de ARNm en el doble mutante Pto *amrZ/fleQ*, tanto en ausencia como en presencia de PleD*, eran máximos, siendo incluso superiores a los de la cepa silvestre en presencia de *pleD** (Figura 54).

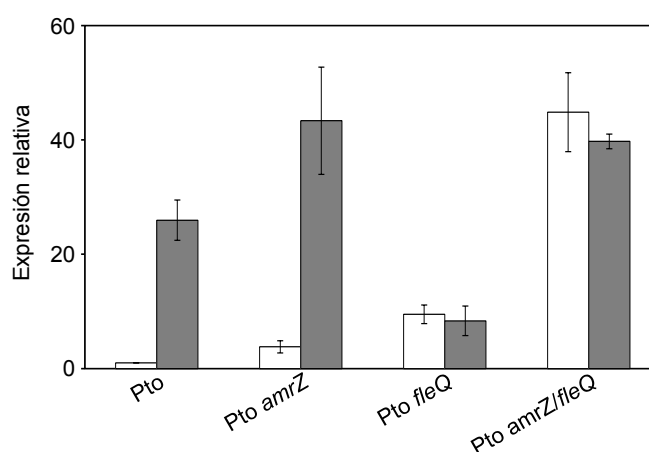


Figura 54. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión relativa de *wssB* en las cepas silvestre y mutantes *amrZ*, *fleQ* y *amrZ/fleQ*. Todas las cepas en ausencia (blanco) y en presencia (gris) de *pleD** se cultivaron en MMR durante 24 h a 20°C en agitación, tras lo cual se extrajo el ARN total. La expresión se normalizó con el gen *gyrA*. Las medidas corresponden a la media de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas con sus desviaciones típicas.

Estos resultados indican que en el doble mutante Pto *amrZ/fleQ* la eliminación del efecto represor de AmrZ y FleQ tiene un efecto aditivo que induce la expresión del operón *wss* a niveles superiores a los observados en los mutantes simples (*amrZ* o *fleQ*). Asimismo, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm de *wssB* al incrementar los niveles de c-di-GMP, por lo que basta con eliminar el efecto represor de ambos reguladores para inducir la expresión del operón *wss* a niveles máximos y hacerla independiente de FleQ y c-di-GMP.

4.2.2. Efecto de AmrZ y FleQ en la producción de celulosa

Tras observar que bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP, la transcripción del operón de síntesis de la celulosa en el doble mutante Pto *amrZ/fleQ* estaba incrementada con respecto a la cepa silvestre y los respectivos mutantes simples, se procedió a estudiar si esto se traducía en un aumento en la producción de celulosa cuantificándola en las cepas Pto y Pto *amrZ/fleQ*. Se observó que la cantidad de celulosa sintetizada por el doble mutante Pto *amrZ/fleQ* en ausencia y en presencia de PleD* era similar y comparable a la producida por la cepa parental sobreexpresando *pleD** (Figura 55).

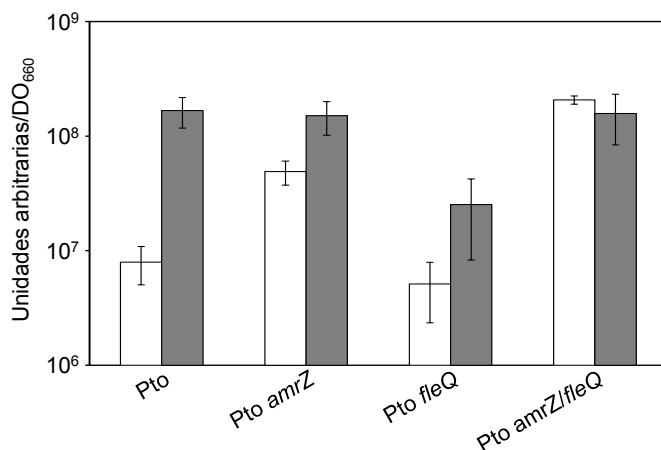


Figura 55. Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos de Pto y sus mutantes en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Pto, Pto *amrZ*, Pto *fleQ* y Pto *amrZ/fleQ* con pJB3Tc19 (blanco) o pJBpleD* (gris) se cultivaron en MMR con CF (100 μ M) durante 24 h a 20°C para posteriormente medir la emisión de fluorescencia del CF unido a las diferentes cepas (ver apartado 7.1.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se expresa la fluorescencia (en unidades arbitrarias) por unidad de absorbancia del cultivo a 660 nm (DO₆₆₀). Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas de al menos 3 muestras independientes.

4.3. Modelo de regulación de la producción de celulosa en Pto DC3000

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral con los reguladores transcripcionales AmrZ y FleQ en Pto DC3000, junto con los resultados publicados sobre dichos reguladores en otras bacterias del género *Pseudomonas* (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2014; Martínez-Granero *et al.*, 2014) no permiten establecer con exactitud el mecanismo de regulación de la biosíntesis de celulosa en Pto DC3000, pero sí proponer un modelo (Figura 56).

Ambos reguladores han demostrado unirse directamente a la región promotora del operón *wss*, inhibiendo la expresión del mismo bajo niveles fisiológicos de c-di-GMP (de 4 y 10 veces en Pto *amrZ* y Pto *fleQ*, respectivamente; Figura 54). Más aún, el efecto aditivo de la doble mutación *amrZ/fleQ* sobre la expresión de *wss* en condiciones basales de c-di-GMP (más de 40 veces) parece indicar que estos son reguladores independientes que convergen en la regulación del operón de síntesis de la celulosa, a diferencia de lo descrito en otras especies del género. Así, en *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, los reguladores transcripcionales AmrZ y FleQ forman parte de la misma cascada de regulación orientada hacia la producción de EPS (Tart *et al.*, 2005; Martínez-Granero *et al.*, 2012; Fazli *et al.*, 2014; Martínez-Gil *et al.*, 2014).

Por otra parte, el comportamiento de estos reguladores transcripcionales es diferente en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Por un lado, en ausencia de AmrZ (Pto *amrZ*) el incremento de los niveles de c-di-GMP sigue induciendo la expresión del operón *wss*, lo que no se observa en un mutante *fleQ*. Es más, en ausencia de este regulador la expresión del operón de síntesis de la celulosa es intermedia (8-10 veces más que la cepa silvestre, Figura 54), independientemente de los niveles de c-di-GMP. Estos resultados se explican si consideramos que FleQ de Pto posee las mismas actividades que FleQ de *P. aeruginosa*: es capaz de unir c-di-GMP y funciona como regulador dual según los niveles de este segundo mensajero, con actividad represora en ausencia de c-di-GMP y activadora tras su unión a este (Hickman y Harwood, 2008; Baraquet *et al.*, 2012). En este sentido, la máxima expresión del operón *wss* en Pto solo se consigue en presencia de FleQ y altos niveles de c-di-GMP [25 veces más en Pto (pJBpleD*) que en Pto (pJB3Tc19)] y su ausencia (Pto *fleQ*) provoca un estado de expresión intermedio que es independiente de los niveles de este segundo mensajero, ya que se elimina la acción represora pero también la activadora de este regulador sobre el operón. Este último papel activador parece estar directamente relacionado con la actuación del represor AmrZ, ya que en ausencia de AmrZ, se alcanzan niveles máximos de expresión cuando FleQ tampoco está presente. Por tanto, proponemos que el complejo FleQ/c-di-GMP bloquea la unión del represor AmrZ a su operador en el promotor *wss*, bien porque genera un cambio conformacional en la región promotora o bien porque interacciona directamente con AmrZ (Figura 56).

En el proceso de producción de celulosa, no hay que olvidar el segundo nivel de regulación por c-di-GMP: la activación alostérica de la celulosa sintasa (WssB) a través de su dominio PilZ. En este sentido y según lo esperado, la presencia de PleD* provocó un incremento generalizado en la transcripción del operón *wss* en Pto, que se tradujo de forma general en un aumento de la producción de celulosa. Sin embargo, hay que matizar que, por ejemplo, en ausencia de AmrZ (Pto *amrZ*) y bajo niveles basales de c-di-GMP, se genera un incremento discreto en la transcripción del operón *wss* (4 veces superior a la cepa silvestre, Figura 54) que, sin embargo, genera una fuerte producción de celulosa (Figura 55). Esto sugiere que AmrZ podría estar reprimiendo, además del operón *wss*, la expresión de alguna DGC o activando alguna PDE implicada en generar o degradar, respectivamente, el c-di-GMP que activa alostéricamente a WssB en Pto. En ese sentido, en *P. aeruginosa* se ha demostrado que AmrZ reprime la expresión de la DGC AdcA (REC-REC-GGDEF), cuya función es necesaria para la formación de biopelículas y la morfología de colonia RSCV (Jones *et al.*, 2014). Sin embargo, en Pto, al contrario que en *P. aeruginosa*,

no se detectaron diferencias significativas entre los niveles intracelulares de c-di-GMP del mutante Pto *amrZ* y de la cepa silvestre en las condiciones ensayadas (Figura 46). No obstante, como se apuntó anteriormente, dada la baja sensibilidad de la técnica empleada para la cuantificación, no podemos descartar que AmrZ esté alterando los niveles de este segundo mensajero mediante la regulación de alguna(s) DGC y/o PDE de forma específica, sin influir en los niveles intracelulares totales de c-di-GMP en Pto. Un interesante candidato a considerar en estudios futuros es la proteína MorA (PSPTO_4631), identificada en la mutagénesis generalizada (capítulo III) como responsable de un fenotipo CR⁺⁺, que porta dominios GGDEF y EAL hipotéticamente activos y que, por tanto, podría actuar como DGC y PDE.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la regulación del operón de síntesis de la celulosa en Pto DC3000 es muy compleja, produciéndose seguramente a varios niveles (transcripcional y posttranscripcional; Figura 56). Además, intervienen varios reguladores transcripcionales y probablemente otras proteínas que interactúan con c-di-GMP. Igualmente, existen elementos aún desconocidos cuyo papel está por determinar, como los sensores y las cascadas de señalización que desembocan en FleQ y AmrZ. Lo que sí parece claro es que el segundo mensajero c-di-GMP desempeña un papel crucial en la regulación de la producción de celulosa en Pto DC3000, seguramente porque las implicaciones fisiológicas de este biopolímero deben ser muy importantes para la bacteria.

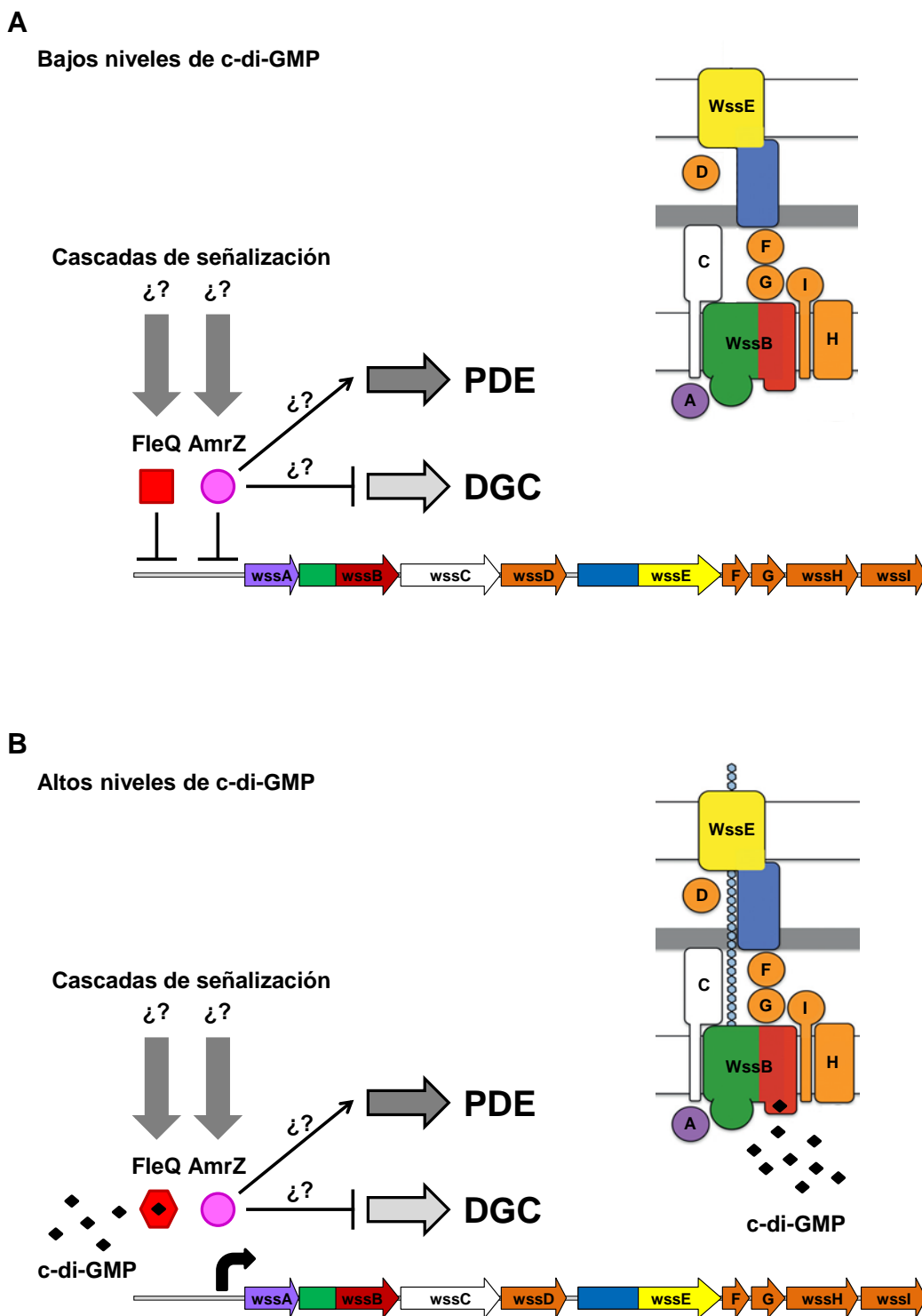


Figura 56. Modelo de regulación de la producción de celulosa en Pto DC3000. Representación esquemática de los mecanismos de regulación de la producción de celulosa a nivel transcripcional y alostérica mediados por AmrZ y FleQ en Pto en condiciones de bajos (A) y altos (B) niveles de c-di-GMP. Modificado de Whitney y Howell, 2013.

DISCUSIÓN

El diguanilato cíclico (c-di-GMP) es un segundo mensajero empleado por muchas bacterias para regular numerosas funciones celulares, como la biosíntesis y secreción de adhesinas y exopolisacáridos, diferentes formas de motilidad, respuesta a condiciones de estrés, síntesis de metabolitos secundarios, progresión del ciclo celular y virulencia en bacterias patógenas (Jenal y Malone, 2006; Schirmer y Jenal, 2009; Tamayo *et al.*, 2007). A su vez, la síntesis e hidrólisis de este segundo mensajero se encuentra modulada por distintos sistemas de transducción de señales, por lo que muchos estímulos ambientales y/o celulares son integrados dentro de la red regulatoria de este segundo mensajero (Galperin *et al.*, 2001). De este modo, el c-di-GMP se encarga de traducir distintas señales extracelulares e intracelulares en respuestas fisiológicas específicas mediante la unión a una amplia gama de efectores, regulando procesos bacterianos vitales como la transición de un estilo de vida móvil a otro sésil asociado con la formación de biopelículas y la expresión de factores de adhesión (Camilli y Bassler, 2006; Jenal y Malone, 2006; Mills *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta la gran variedad de procesos regulados por el c-di-GMP, es posible que este segundo mensajero juegue un papel determinante en bacterias que interactúan con plantas, tanto de manera simbiótica como patogénica, a través de la regulación de sus estilos de vida. Es, por tanto, un reto dilucidar cómo llevan a cabo esa transición; es decir, qué señales la desencadenan, cómo funcionan los sistemas de transducción implicados, cómo confieren especificidad a estos sistemas para evitar el entrecruzamiento de señales, qué efectores colaboran en estas cascadas y qué procesos celulares se ven afectados. En ese sentido, los genomas de bacterias asociadas a plantas codifican un alto número de proteínas que interactúan con c-di-GMP implicadas, tanto en su síntesis como en su degradación, pero también efectoras y reguladoras (Seshasayee *et al.*, 2010), lo que sugiere la existencia de un estricto control sobre los niveles de este segundo mensajero. Por ejemplo, en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* se ha puesto de manifiesto que el c-di-GMP está implicado en la detección y producción de factores dependientes de *quorum sensing*, en la disociación de biopelículas, en la motilidad tipo *twitching* y en la síntesis de factores de virulencia (Leduc *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2010). No obstante, al contrario de lo que ocurre en otros modelos bacterianos, las funciones del c-di-GMP en bacterias simbióticas o en otros patógenos vegetales, como en los distintos patovares de *P. syringae*, están aún bastante inexploradas. Las bacterias del grupo *syringae*, que son patógenas de plantas, tienen la ventaja de pertenecer a un género muy diverso que incluye especies patógenas de humanos y animales (*P. aeruginosa*), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*P. fluorescens*) o bacterias de interés industrial por su alta capacidad de degradación de compuestos aromáticos y xenobióticos (*P. putida*). Los análisis comparativos y multidisciplinarios de las proteínas implicadas en la interacción con el c-di-GMP en diferentes bacterias son necesarios para lograr una mejor comprensión de las señales intercambiadas en las complejas asociaciones planta-microorganismo y contribuyen a determinar qué proteínas pueden ser esenciales para el establecimiento de un determinado estilo de vida. Asimismo, a largo plazo, también pueden ayudar al desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas y/o estrategias para el control de enfermedades.

Los resultados *in silico* obtenidos en esta tesis doctoral apuntan a que en Pto y Sme, efectivamente, los mecanismos de señalización en los que interviene este segundo mensajero son complejos. Así, las DGC,

además de poseer una gran variedad de dominios adicionales (sensores, reguladores y transmembrana), presentan los 4 tipos de combinaciones posibles para este tipo de proteínas (I⁺A⁻, I⁺A⁺, I⁻A⁺ y I⁻A⁻; Jenal y Malone, 2006). Particularmente, en la familia Pseudomonadaceae se ha observado que determinadas proteínas con dominios PilZ, GGDEF, EAL o HD-GYP están conservadas en *Pseudomonas* patógenas de plantas y son exclusivas de la especie *P. syringae*, otras están presentes en *Pseudomonas* que interactúan con plantas, tanto beneficiosas como patogénicas y, por último, existen proteínas más ampliamente distribuidas y presentes en todas las especies analizadas del género *Pseudomonas*. De forma similar, en los rizobios se identificaron proteínas con dominios de interacción con c-di-GMP exclusivas de la cepa *S. meliloti* 1021, proteínas presentes en otras cepas del género *Sinorhizobium*, otras presentes en los miembros de la familia Rhizobiaceae y otras exclusivas de otras familias del orden Rhizobiales (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). Hay que señalar que, pese a las similitudes encontradas en la organización estructural de numerosas proteínas de Pto y Sme, el estudio comparativo de estos dos grandes grupos mostró que tan solo existe una proteína que interactúa con c-di-GMP conservada en *Pseudomonas* y rizobios, lo que sugiere una gran diversificación evolutiva y especialización de estos sistemas de señalización en los distintos taxones bacterianos.

Como una aproximación al estudio de la importancia del c-di-GMP en Pto, se alteraron los niveles intracelulares de este segundo mensajero mediante la sobreexpresión de la DGC heteróloga PleD*. El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP tuvo un impacto notable en distintos comportamientos de vida libre como la motilidad, la morfología de colonia, la formación de biopelículas y la secreción de proteínas. De forma análoga a lo descrito en otros grupos bacterianos, los altos niveles de c-di-GMP provocaron inhibición de motilidad y generaron morfologías de colonia compatibles con la sobreexpresión de EPS, similares a los fenotipos *rdar* de *Salmonella* o *WS* de *P. aeruginosa* (Friedman y Kolter, 2004; Kader *et al.*, 2006). Llama la atención que aunque el aumento de los niveles de c-di-GMP tenga un efecto tan acusado sobre los fenotipos de Pto asociados a vida libre y además reprima la expresión del T3SS, la interacción con su planta hospedadora y los síntomas provocados, no se afectan significativamente, a diferencia de lo observado en otras bacterias (Ryan *et al.*, 2007; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). En ese sentido, la expresión de los distintos factores de virulencia de Pto (T3SS, toxinas, producción de EPS, etc.) es muy compleja y está controlada a distintos niveles. PleD* provoca un aumento generalizado del c-di-GMP intracelular, lo que activa unos fenotipos y reprime otros. El hecho de que la virulencia de Pto no resulte afectada sugiere que esas acciones se contrarrestan de modo que, por ejemplo, la producción de EPS podría compensar el efecto negativo de la represión parcial del T3SS.

El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP, ha demostrado ser útil para poner de manifiesto la producción de nuevos EPS y otras sustancias dependientes de c-di-GMP en bacterias (Xu *et al.*, 2013, Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; 2014). En Pto dicho incremento provocó un fenotipo de colonia denominado CR⁺/CF⁺ (colonias más rojas en CR y más fluorescentes en CF respecto a la cepa parental), que permitió diseñar una estrategia de mutagénesis generalizada con el fin de encontrar genes implicados en ese fenotipo dependiente de los niveles de c-di-GMP. Curiosamente, con esta aproximación se encontraron genes cuya mutación causaba, tanto la pérdida del fenotipo (CR⁻/CF⁻), como la exacerbación del mismo

(CR⁺⁺/CF⁺⁺). La mayoría de genes mutados asociados al fenotipo CR⁻ se localizaron dentro del operón de síntesis de la celulosa *wssABCDEFGHI*, indicando que este compuesto se está produciendo en respuesta a elevados niveles de c-di-GMP en Pto. Pero también se obtuvieron mutantes CR⁻ en otros genes de función desconocida: un transportador de tipo RND y una proteína hipotética con un dominio glucosiltransferasa, que podrían estar implicados en el proceso de producción de este biopolímero, en su transporte a través de la membrana celular o provocando modificaciones postraduccionales en la celulosa. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, el papel activador del c-di-GMP sobre la producción y secreción de numerosos EPS en bacterias, como celulosa, N-acetil-glucosamina, alginato, curdlan, Psl, Pel o levanos (Kuchma *et al.*, 2007; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; Ruffing y Chen, 2012; Whitney y Howell, 2013). En estos casos, el c-di-GMP ejerce su función bien a través de la regulación alostérica de la enzima de síntesis (Fujiwara *et al.*, 2013) o bien regulando el proceso de secreción (Steiner *et al.*, 2013).

Por el contrario, los mutantes con fenotipo CR⁺⁺ se encontraron afectados en genes de funciones variadas: un transportador de tipo ABC, proteínas relacionadas con citocromos, una helicasa y una proteína con dominios GGDEF/EAL, cuya relación con el fenotipo CR⁺⁺/CF⁺⁺ no está clara hasta el momento. Sin embargo, debido a la novedad en su vínculo con el c-di-GMP de muchas de ellas, auguran líneas de estudio futuras muy interesantes.

En la mutagénesis también se obtuvo un mutante en el gen PSPTO_1847 que, en presencia de altos niveles de c-di-GMP, hiperproduce celulosa generando un fenotipo CR⁺⁺. PSPTO_1847 ha sido denominado AmrZ en *P. aeruginosa* y es un regulador transcripcional que posee un dominio de unión a ADN de tipo *ribbon-helix-helix* (Pryor, *et al.*, 2012). Este hecho apuntaba a la posibilidad de que la producción de celulosa en Pto, además de poder estar regulada positivamente a nivel postraduccionales mediante la activación alostérica del dominio PilZ presente en la celulosa sintasa WssB, estuviera sometida a una regulación transcripcional directa. Este hecho se corroboró mediante qRT-PCR, observándose que, efectivamente, el incremento de los niveles de c-di-GMP inducía la transcripción del operón *wss*. Esta regulación transcripcional sobre el operón de síntesis de celulosa en Pto es un hecho poco frecuente en bacterias. En otras bacterias donde se ha estudiado el proceso extensamente como *G. xylinum*, *E. coli*, *Salmonella* o *A. tumefaciens*, no se ha descrito una regulación transcripcional del operón de biosíntesis, expresándose de forma constitutiva en algunas de ellas. En estas bacterias son una o varias DGC o PDE las encargadas de regular indirectamente la actividad de las respectivas celulosas sintasas a través del control de los niveles de c-di-GMP (Saxena *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2001; Barnhart *et al.*, 2013).

Un estudio más detallado puso de manifiesto que, además del represor transcripcional AmrZ, el regulador FleQ juega un papel crucial en la regulación transcripcional del operón *wss*. Dicho regulador parece tener en Pto un papel dual según los niveles de este segundo mensajero, actuando como represor en ausencia de c-di-GMP y como activador tras la unión a este. Este papel dual de FleQ ha sido descrito recientemente en la regulación transcripcional del operón *pel* en *P. aeruginosa* (Baraquet *et al.*, 2012). Resulta curioso observar cómo se ha conservado un sistema de regulación por c-di-GMP en *P. aeruginosa* y Pto sobre dos EPS diferentes, celulosa, presente en Pto y ausente en *P. aeruginosa* y Pel, presente en

Discusión

P. aeruginosa y ausente en Pto. Estos resultados en conjunto indican que en Pto la regulación del operón de síntesis de la celulosa es muy complejo, e intervienen distintos reguladores transcripcionales que posiblemente respondan a los niveles de c-di-GMP. Sin embargo, los mecanismos moleculares y/o señales celulares que regulan la actividad de estos reguladores sobre el operón *wss* están aún por descubrir.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El análisis *in silico* realizado ha puesto de manifiesto que los genomas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y *Sinorhizobium meliloti* 1021 codifican un alto número de proteínas potencialmente relacionadas con el c-di-GMP y destaca la importancia de la regulación de los niveles de este segundo mensajero en bacterias que interactúan con plantas, tanto de manera simbiótica como patogénica.
2. Muchas de estas proteínas se encuentran asociadas a dominios sensores y transmembrana, lo que sugiere que la actividad DGC y PDE en estas dos bacterias se encuentra regulada por diversos estímulos ambientales y que la síntesis del c-di-GMP se encuentra frecuentemente vinculada a la membrana celular.
3. El análisis comparativo de proteínas que interactúan con c-di-GMP en Pto y Sme ha puesto de manifiesto que, pese a las similitudes encontradas en la organización estructural de numerosas proteínas de estas dos especies, tan solo existe una proteína conservada en *Pseudomonas* y rizobios. Esto sugiere que ha tenido lugar una gran diversificación evolutiva y especialización de estos sistemas de señalización en los distintos taxones. Del mismo modo, se identificaron proteínas específicas de patovar/biovar, lo que indica que algunas de ellas deben ser esenciales para un determinado estilo de vida bacteriano.
4. El incremento artificial de los niveles de c-di-GMP provoca un impacto notable en distintos comportamientos de vida libre de Pto: disminución acusada de la motilidad tanto *swimming* como *swarming*, alteraciones en la morfología de las colonias en placa, incremento en la producción de EPS y aumento en la formación de biopelículas en la interfase líquido-aire. Sin embargo, el incremento de los niveles de este segundo mensajero no tuvo un impacto significativo sobre la virulencia de Pto en plantas de tomate.
5. Mediante una estrategia de mutagénesis generalizada se identificaron en Pto genes implicados, tanto en la pérdida del fenotipo asociado a la producción de ciertos EPS (CR⁻/CF⁻), como en la exacerbación del mismo (CR⁺⁺/CF⁺⁺) en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Además, algunos de estos genes están implicados en la virulencia de esta bacteria.
6. La mayoría de los mutantes CR⁻ obtenidos se localizaron en el operón de síntesis de la celulosa *wss*, lo que indica que este compuesto se está produciendo en respuesta a los elevados niveles de c-di-GMP en Pto. Asimismo, se identificaron otros genes que, directa o indirectamente, son necesarios para la síntesis y/o transporte de este u otro polisacárido implicado en el fenotipo CR⁺.

7. Se ha puesto de manifiesto que la expresión del operón de biosíntesis de la celulosa de Pto (*wssABCDEFGHI*) está controlada a nivel transcripcional por c-di-GMP a través de los reguladores transcripcionales AmrZ y FleQ. Ambos se unen en la región promotora del operón y FleQ tiene un papel dual según los niveles de c-di-GMP: actúa como represor cuando los niveles son bajos y como activador tras la unión a este cuando los niveles son altos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., Chien, P., Wassmann, P., Schirmer, T., Kaefer, V., Laub, M.T., Baker, T.A. y Jenal, U. (2011) Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Mol Cell* **43**: 550-560.
- Abramovitch, R.B. y Martin, G.B. (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 356-364.
- Abrusci, P., McDowell, M.A., Lea, S.M. y Johnson, S. (2014) Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS. *Curr Opin Struct Biol* **1**: 111-117.
- Ahmad, I., Lamprokostopoulou, A., Le, G.S., Streck, E., Peters, V., Barthel, M., Hardt, W-D. y Römling, U. (2011) Complex c-di-GMP signaling networks mediate the transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* **6**: e28351.
- Akerley, B.J., Cotter, P.A. y Miller, J.F. (1995) Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**: 611-620.
- Alarcon-Chaidez, F.J., Keith, L., Zhao, Y., y Bender, C.L. (2003) RpoN (σ^{54}) is required for plasmid-encoded coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*. *Plasmid* **49**: 106-117.
- Albareda, M., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megías, M., Temprano, F. y Rodriguez-Navarro, D.N. (2006) Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean y soybean roots. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 67-73.
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. y Jenal, U. (2003) Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**: 1695-1708.
- Alfano, J.R. y Collmer, A. (1997) Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K. y Collmer, A. (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4856-4861.
- Alfano, J.R. y Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414.
- Allison, C.L., Emody, N., Coleman, N. y Hughes, C. (1994) The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J Infect Dis* **169**: 1155-1158.
- Alm, R.A., Boder, A.J., Free, P.D. y Mattick, J.S. (1996) Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 46-53.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Altschul, S.F. y Koonin, E.V. (1998) Iterated profile searches with PSI-BLAST—a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem Sci* **23**: 444-447.
- Amikam, D. y Benziman, M. (1989) Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **171**: 6649-6655.
- Amikam, D., Steinberger, O., Shkolnik, T. y Ben-Ishai, Z. (1995) The novel cyclic dinucleotide 3'-5' cyclic diguanylic acid binds to p21ras and enhances DNA synthesis but not cell replication in the Molt 4 cell line. *Biochem J* **311**: 921-927.
- Amikam, D. y Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Anantharaman, V. y Aravind, L. (2000). "Cache - a signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors". *Trends Biochem Sci* **25**: 535-537.
- Anantharaman, V. y Aravind, L. (2003) Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics* **4**: 34.
- Andersen, M.R., Salazar, M.P., Schaap, P.J., Van, D., Culley, D., Thykaer, J., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Albang, R., Albermann, K., Berka, R.M., Braus, G.H., Braus-Stromeyer, S.A., Corrochano, L.M., Dai, Z., Van, P.W., Hofmann, G., Lasure, L.L., Magnuson, J.K., Menke, H., Meijer, M., Meijer, S.L., Nielsen, J.B., Nielsen, M.L., Van, A.J., Pel, H.J., Poulsen, L., Samson, R.A., Stam, H., Tsang, A., Van, J.M., Atkins, A., Aerts, A., Shapiro, H., Pangilinan, J., Salamov, A., Lou, Y., Lindquist, E., Lucas, S., Grimwood, J., Grigoriev, I.V., Kubicek, C.P., Martinez, D., Roubos, J.A., Nielsen, J. y Baker, S.E. (2011) Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* **21**: 885-897.
- Anderson, J.K., Smith, T.G., y Hoover, T.R. (2010) Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* **18**: 30-37.

Bibliografía

- Ankarloo, J., Zhang, M.Y. y Lovgren, A. (1996) Regulatory sequences of two flagellin genes in *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*. *Microbiology* **142**: 315-320.
- Apel, D. y Surette, M.G. (2008) Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1851-1858.
- Aravind, L. y Koonin, E.V. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**: 469-472.
- Aravind, L. y Ponting, C.P. (1999) The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett* **176**: 111-116.
- Armitage, J.P. y Berry, R.M. (2010) Time for bacteria to slow down. *Cell* **141**: 24-26.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. y Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**: 5574-5581.
- Arrebola, E., Cazorla, F., Codina, J., Gutiérrez-Barranquero, J., Pérez-García, A. y de Vicente, A. (2009) Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Int Microbiol* **12**: 87-95.
- Arslan, E., Kannt, A., Thöny-Meyer, L. y Hennecke, H. (2000) The symbiotically essential *cbb3*-type oxidase of *Bradyrhizobium japonicum* is a proton pump. *FEBS Lett* **470**: 7-10.
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. y Lindberg, M. (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* **145**: 1253-1262.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman y Lindberg, M. (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol* **204**: 163-167.
- Baillie, G.S. (2009) Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J* **276**: 1790-1799.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D. y Dangl, J.L. (2011) Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7**: e1002132.
- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M.R. y 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 Res* **40**: 7207-7218.
- Baraquet, C. y Harwood, C.S. (2013) Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 18478-18483.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y. y Jarrell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., Gurjal, M., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Palm, C., Peck, M.C., Surzycki, R., Wells, D.H., Yeh, K.C., Davis, R.W., Federspiel, N.A. y Long, S.R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *P Natl A Sci* **98**: 9883-9888.
- Barnhart, D.M., Su, S., Baccaro, B.E., Banta, L.M. y Farrand, S.K. (2013) CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *Caulobacter*, regulates cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 7188-7202.
- Barrick, J.E. y Breaker, R.R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8**: 239.
- Bassis, C.M. y Visick, K.L. (2010) The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **192**: 1269-1278.
- Baynham, P.J. y Wozniak, D.J. (1996) Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* algD transcription. *Mol Microbiol* **22**: 97-108.
- Baynham, P.J., Brown, A.L., Hall, L.L. y Wozniak, D.J. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and algD transcriptional activation. *Mol Microbiol* **33**: 1069-1080.
- Baynham, P.J., Ramsey, D.M., Gvozdyev, B.V., Cordonnier, E.M. y Wozniak, D.J. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *J Bacteriol* **188**: 132-140.

- Beavo, J.A. y Brunton, L.L. (2002) Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 710-718.
- Bellini, D., Caly, D.L., McCarthy, Y., Bumann, M., An, S.Q., Dow, J.M., Ryan, R.P. y Walsh, M.A. (2013) Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol* **91**: 26-38.
- Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F. y Gross, D.C. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 266-292.
- Bender, C., Rangaswamy, V. y Loper, J. (1999) POLYKETIDE PRODUCTION BY PLANT-ASSOCIATED PSEUDOMONADS. *Annu Rev Phytopathol* **37**: 175-196.
- Benziman, M., Haigler, C.H., Brown, R.M., White, A.R. y Cooper, K.M. (1980) Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**: 6678-6682.
- Bernier, S.P., Ha, D.G., Khan, W., Merritt, J.H. y O'Toole, G.A. (2011). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res Microbiol* **162**: 680-688.
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H. y Thomas, M.G. (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J Bacteriol* **189**: 6312-6323.
- Bertinetti, D., Möller, S., Schwede, F., Morr, M., Wissing, J., Radamm, L., Zimmermann, B., Genieser, H.G., Jansch, L., Herberg, F.W. y Häussler, S. (2012) A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **88**: 229-236.
- Beyhan, S., Tischler, A.D., Camilli, A. y Yildiz, F.H. (2006) Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J Bacteriol* **188**: 3600-3613.
- Beyhan, S., Odell, L.S. y Yildiz, F.H. (2008) Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **190**: 7392-7405.
- Bharati, B.K., Sharma, I.M., Kasetty, S., Kumar, M., Mukherjee, R. y Chatterji, D. (2012) A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **158**: 1415-1427.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. y Perotto, S. (2001) Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 255-260.
- Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K. y Valla, S. (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* **63**: 370-379.
- Boccardo, M. y Chatain, V. (1989) Regulation and role in pathogenicity of *Erwinia chrysanthemi* 3937 pectin methylesterase. *J Bacteriol* **171**: 4085-4087.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V. y Jenal, U. (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**: 107-116.
- Borlee, B., Goldman, A., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J. y Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* **75**: 827-842.
- Bortoli-German, I., Brun, E., Py, B., Chippaux, M. y Barras, F. (1994) Periplasmic disulphide bond formation is essential for cellulase secretion by the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **11**: 545-553.
- Bott, M. y Brocker, M. (2012) Two-component signal transduction in *Corynebacterium glutamicum* and other corynebacteria: on the way towards stimuli and targets. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1131-1150.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. y Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS Microbiol* **13**: 21-26.
- Breaker, R.R. (2008) Complex riboswitches. *Science* **319**: 1795-1797.
- Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K. y Hutcheson, S.W. (2002) Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **45**: 397-409.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L. y Kunkel, B.N. (2004) Identification and characterization of a well defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 162-174.

Bibliografía

Brouillette, E., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Karaolis, D.K. y Malouin, F. (2005) 3',5'-cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3109-3113.

Brun, Y.V., Marczyński, G. y Shapiro, L. (1994) The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu Rev Biochem* **63**: 419-450.

Burch, A.Y., Shimada, B.K., Mullin, S.W.A., Dunlap, C.A., Bowman, M.J. y Lindow, S.E. (2012) *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J Bacteriol* **194**: 1287-1298.

Burch, A.Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L. y Lindow, S.E. (2014) The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environ Microbiol* **10**: 1462-2920.

Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. y Collmer, A. (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10181-10186.

Burse, A., Weingart, H. y Ullrich, M. (2004a) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 43-54.

Burse, A., Weingart, H. y Ullrich, M.S. (2004b) NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 693-703.

Büttner, D. y He, S.Y. (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* **150**: 1656-1664.

Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J.D., Ermler, U. y Michel, H. (2010) The structure of *ccb3* cytochrome oxidase provides insights into proton pumping. *Science* **329**: 327-330.

Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S. y Wozniak, D.J. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* **73**: 622-638.

Byrd, M.S., Pang, B., Mishra, M., Swords, W.E. y Wozniak, D.J. (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-kappaB activation in A549 cells. *MBio* **1**: e00140.

Byrd, M.S., Pang, B., Hong, W., Waligora, E.A., Juneau, R.A., Armbruster, C.E., Weimer, K.E., Murrain, K., Mann, E.E., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M.R., Kock, N.D., Wozniak, D.J. y Swords, W.E. (2011) Direct evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm mediators in a chronic infection model. *Infect Immun* **79**: 3087-3095.

Cai, R., Yan, S., Liu, H., Leman, S., y Vinatzer, B.A. (2011) Reconstructing host range evolution of bacterial plant pathogens using *Pseudomonas syringae* pv. tomato and its close relatives as a model. *Infect Genet Evol* **11**: 1738-1751.

Camilli, A. y Bassler, B.L. (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* **311**: 1113-1116.

Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Puhler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenbol, M., Weidner, S. y Galibert, F. (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9877-9882.

Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M. y Higgins, D.G. (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J* **13**: 2516-2525.

Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N., Giese, B., Jenal, U. y Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanilate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **282**: 29170-29177.

Chang, A.L., Tuckerman, J.R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. y Gilles-Gonzales, M.A. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* **40**: 3420-3426.

Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R. y Chatterjee, A.K. 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1106-1117.

Chen, Z.H. y Schaap, P. (2012) The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* **488**: 680-683.

- Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z.L., Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H. y Chou, S.H. (2009) The cAMP receptorlike protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signalling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* **396**: 646-662.
- Choi, K.H., Kumar, A. y Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391-397.
- Choy, W.K., Zhou, L., Syn, C.K., Zhang, L.H. y Swarup, S. (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **186**: 7221-7228.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. y Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**: 30829-30837.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. y Jenal, U. (2006) Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281**: 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenoe, P., Grzesiek, S. y Jenal, U. (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4112-4117.
- Clark, W.A. (1976) A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* **3**: 632-634.
- Cody, W.L., Pritchett, C.L., Jones, A.K., Carterson, A.J., Jackson, D., Frisk, A., Wolfgang, M.C. y Schurr, M.J. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR controls cyanide production in an AlgZ-dependent manner. *J Bacteriol* **191**: 2993-3002.
- Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L. y Parsek, M.R. (2011a) The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **7**: e1001264.
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J. y Parsek, M.R. (2011b) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* **8**: 1913-1928.
- Comolli, J.C. y Donohue, T.J. (2004) Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb₃* cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**: 1193-1203.
- Cooper, D.M. (2003) Regulation y organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* **375**: 517-529.
- Coplin, D.L. y Cook, D. (1990) Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **3**: 271-279.
- Cosseau, C. y Batut, J. (2004) Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb₃* oxidasecomplex in bacteria. *Arch. Microbiol* **181**: 89-96.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. y Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Cotter, P.A. y Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**: 17-23.
- Coulthurst, S.J., Lilley, K.S. y Salmond, G.P. (2006) Genetic and proteomic analysis of the role of luxS in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Pathol* **7**: 31-45.
- Coulthurst, S.J., Lilley, K.S., Hedley, P.E., Liu, H., Toth, I.K. y Salmond, G.P. (2008) DsbA plays a critical and multifaceted role in the production of secreted virulence factors by the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *J Biol Chem* **283**: 23739-23753.
- Crooke, H. y Cole, J. (1995) The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. *Mol Microbiol* **15**:1139-1150.
- Cruz, D.P., Huertas, M.G., Lozano, M., Zarate, L. y Zambrano, M.M. (2012) Comparative analysis of diguanylate cyclase and phosphodiesterase genes in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol* **12**: 139-147.
- Cuppels, D.A. (1986) Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl Environ Microbiol* **51**: 323-327.
- Cuppels, D.A. y Ainsworth, T. (1995) Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. maculicola strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3530-3536.
- Cuthbertson, L., Kos V. y Whitfield, C. ABC Transporters Involved in Export of Cell Surface Glycoconjugates. *Microbio Mol Biol Rev* **75**: 341-362.
- Dagnall, B.H., Paulsen, I.T. y Saier, M.H. (1995) The DAG family of glycosyl hydrolases combines two previously identified protein families. *Biochem J* **311**: 349-350.
- Danhorn, T. y Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 401-422.

Bibliografía

- Dasgupta, N., Arora, S.K. y Ramphal, R. (2000) *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 357-364.
- Dasgupta, N. y Ramphal, R. (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 6636-6644.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E. y Ramphal, R. (2002) *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is $\sigma 70$ dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S. y Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**: 809-824.
- De Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B. y Timmis, K.N. (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using Lacq/Ptrp-lac plasmids and transposons that confers conditional phenotype. *Gene* **123**: 17-24.
- De, N., Navarro, M.V., Raghavan, R.V. y Sondermann, H. (2009) Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* **393**: 619-633.
- Demarre, G., Guérout, A.M., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D.A., Marlière, P. y Mazel, D. (2005) A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res Microbiol* **156**: 245-255.
- Denny, T.P. (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 173-197.
- Denis, J.J. y Zylstra, G.J. (1998) Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2710-2715.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J. y Paiva, N.L. (1996) Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review. *Gene* **179**: 61-71.
- Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**: 843-847.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881-890.
- Dow, J.M., Fouhy, Y., Lucey, J.F. y Ryan, R.P. (2006) The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1378-1384.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. y Jenal, U. (2009) Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**: 93-104.
- Ducluzeau, A., Ouchane, S. y Nitschke, W. (2008) The *cbb₃* oxidases are an ancient innovation of the domain bacteria. *Mol Biol Evol* **25**: 1158-1166.
- Dulla, G., Marco, M., Quinones, B. y Lindow, S.A. (2005) A closer look at *Pseudomonas syringae* as a leaf colonist. *ASM News* **71**: 469-475.
- Düvel, J., Bertinetti, D., Möller, S., Schwede, F., Morr, M., Wissing, J., Radamm, L., Zimmermann, B., Genieser, H.G., Jansch, L., Herberg, F.W. y Häussler, S. (2012) A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **88**: 229-236.
- Erhardt, M., Namba, K. y Hughes, K.T. (2010) Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: 6.
- Evans, L.R. y Linker, A. (1973) Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **116**: 915-924.
- Fakhr, M.K., Penalzoza-Vazquez, A., Chakrabarty, A.M. y Bender, C.L. (1999) Regulation of alginate biosynthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **181**: 3478-3485.
- Fang, X. y Gomelsky, M. (2010) A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* **76**: 1295-1305.
- Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K., Dow, J.M., Givskov, M., Ryan, R.P. y Tolker-Nielsen, T. (2011) The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* **82**: 327-341.
- Fazli, M., Almblad, H., Rybtke, M.L., Givskov, M., Eberl, L. y Tolker-Nielsen, T. (2014) Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol* **12448**.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., Thiel, J., Malfatti, S., Loper, J.E., Lapidus, A., Detter, J.C., Land, M., Richardson, P.M., Kyrpides, N.C., Ivanova, N. y Lindow, S.E. (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11064-11069.

- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H y Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**: 43-51.
- Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H. (1987) Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147-154.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., Wehling, M.D., Alfano, J.R., Moreno-Hagelsieb, G., Lamboy, W.F. et al. 2006. Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp cis element, and identifies novel coregulated genes. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1167-1179.
- Ferreira, R.B., Antunes, L.C., Greenberg, E.P. y McCarter, L.L. (2008) *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J. Bacteriol* **190**: 851- 860.
- Ferris, H.U. y Minamino, T. (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol* **14**: 519-526.
- Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B. y Pühler, A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *P Natl A Sci* **98**: 9889-9894.
- Fineran, P.C., Williamson, N.R., Lilley, K.S. y Salmond, G.P. (2007) Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *J Bacteriol* **189**: 7653-7662.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. y Bateman, A. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: 281-288.
- Flemming, H.C. y Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623-633.
- Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M. y Giuffrè, A. (2001) The cytochrome *cbb₃* from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *Eur J Biochem* **268**: 6486-6491.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G., Lin, N.C., Martin, G.B., Rehm, A.H., Schneider, D.J., van Dijk, K., Tang, X. y Collmer, A. (2002) Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2275-2280.
- Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T. y Howell, P.L. (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* **2**: 167.
- Fraser, G.M. y Hughes. C. (1999) Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**: 630-635.
- Friedman, L. y Kolter, R. (2004a) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**: 4457-4465.
- Friedman, L. y Kolter, R. (2004b) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 675-690.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K. y Ramphal, R. (2002) Identification and functional characterization of *flgM*, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**: 1514-1521.
- Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I. y Yao, M. (2013) The c-di-GMP recognition mechanism of the PilZ domain of bacterial cellulose synthase subunit A. *Biochem Biophys Res Commun* **431**: 802-807.
- Furuchi, T., Kashiwagi, K., Kobayashi, H. y Igarashi, K. (1991) Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem* **266**: 20928-20933.
- Ghafoor, A., Hay, I.D. y Rehm, B.H. (2011) The role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5238-5246.
- Galán, J.E. y Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Galibert, F. (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9877-9882.
- Galperin, M.Y., Natale, D.A., Aravind, L. y Koonin, E.V. (1999) A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 303-305.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. y Koonin, E.V. (2001a) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 11-21.
- Galperin, M.Y., Gaidenko, T.A., Mulkidjanian, A.Y., Nakano, M. y Price, C.W. (2001b) MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 17-23.

Bibliografía

- Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- Galperin, M.Y., Higdon, R. y Kolker, E. (2010) Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst* **6**: 721-728.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F. y Grimont, P.A.D. (1999) DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Syst Bacteriol* **49**: 469-478.
- Ghafoor, A., Hay, I.D. y Rehm, B.H. (2011) The role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* **77**: 5238-5246.
- Giddens, S.R., Jackson, R.W., Moon, C.D., Jacobs, M.A., Zhang, X.X., Gehrig, S.M. y Rainey, P.B. (2007) Mutational activation of niche-specific genes provides insight into regulatory networks and bacterial function in a complex environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18247-18252.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., y Dessaux, Y. (1998) Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 156-162.
- Goymer, P., Kahn, S.G., Malone, J.G., Gehrig, S.M., Spiers, A.J. y Rainey, P.B. (2006) Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. II. Role of the GGDEF regulator WspR in evolution and development of the wrinkly spreader phenotype. *Genetics* **173**: 515-526.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. y Dangl, J.L. (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449.
- Grimm, C., Aufsatz, W., y Panopoulos, N.J. (1995) The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol* **15**: 155-165.
- Gross, D.C. (1985) Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and defined conditions for its production. *J Appl Bacteriol* **58**: 167-174.
- Güvener, Z.T. y McCarter, L.L. (2003) Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**: 5431-5441.
- Gunasekera, T.S. y Sundin, G.W. (2006) Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solarUVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Appl Microbiol* **100**: 1073-1083.
- Guo, W., Cui, Y.P., Li, Y.R., Che, Y.Z., Yuan, L., Zou, L.F., Zou, H.S. y Chen, G.Y. (2012) Identification of seven *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* genes potentially involved in pathogenesis in rice. *Microbiology* **158**: 505-518.
- Guttenplan, S.B. y Kearns, D.B. (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 849-871.
- Guzzo, C.R., Salinas, R.K., Andrade, M.O. y Farah, C.S. (2009) PilZ protein structure and interactions with PilB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393**: 848-866.
- Guzzo, C.R., Dunger, G., Salinas, R.K. y Farah, C.S. (2013) Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP Complex Responsible for the Regulation of Bacterial Type IV Pilus Biogenesis. *J Mol Biol* **425**: 2174-2197.
- Haefele, D.M. y Lindow, S.E. (1987) Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2528-2533.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. y Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**: 95-108.
- Ham, J.H. (2012) Intercellular and intracellular signalling systems that globally control the expression of virulence genes in plant pathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* **14**: 308-322.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Handa, N., Terada, T., Doi-Katayama, Y., Hirota, H., Tame, J.R., Park, S.Y., Kuramitsu, S., Shirouzu, M. y Yokoyama, S. (2005) Crystal structure of a novel polyisoprenoid-binding protein from *Thermus thermophilus* HB8. *Protein Sci* **14**: 1004-1010.
- Hattermann, D.R. y Ries, S.M. (1989) Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* **79**: 284-289.
- Hay, I.D., Remminghorst, U. y Rehm, B.H. (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1110-1120.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P. y Ausubel, F.M. (2000a) The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *J Bacteriol* **182**: 3508-3516.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., Peñaloza-Vázquez, A., Shao, J., Bender, C. y Ausubel, F.M. (2000b) Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is rpoN dependent. *J Bacteriol* **182**: 3498-3507.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.

- He, Y.W., Ng, A.Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L.H., Dong, Y.H. y Zhang, L.H. (2007) *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network. *Mol Microbiol* **64**: 281-292.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.
- Heras, B., Shouldice, S.R., Totsika, M., Scanlon, M.J., Schembri, M.A. y Martin, J.L. (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **7**: 215-225.
- Hestrin, S., Aschner, M. y Mager, J. (1947) Synthesis of cellulose by resting cells of *Acetobacter xylinum*. *Nature* **159**: 64.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F. y Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14422-14427.
- Hickman, J.W. y Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376-389.
- Hiniker, A., Collet, J.F. y Bardwell, J.C. (2005) Copper stress causes an *in vivo* requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem* **280**: 33785-33791.
- Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S. y Shiro, Y. (2010) Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science* **330**: 1666-1670.
- Hirano, S.S. y Upper, C.D. (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 624-653.
- Hirsch, A., Lum, M. y Fujishige, N. (2009) Microbial Encounters of a Symbiotic Kind: Attaching to Roots and Other Surfaces. *Plant Cell Monographs. Springer Berlin / Heidelberg*.
- Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M.U., Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrst, S., Zhang, Z., Gaffney, B.L., Gandotra, S., Holden, D.W., Murray, D. y Nathan, C. (2005) A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* **56**: 1234-1245.
- Hoover, T.R., Santero, E., Porter, S. y Kustu, S. (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**: 11-22.
- Hu, S. Q., Gao, Y. G., Tajima, K., Sunagawa, N., Zhou, Y., Kawano, S., Fujiwara, T., Yoda, T., Shimura, D., Satoh, Y., Munekata, M., Tanaka, I., and Yao, M. (2010) Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passage ways. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17957-17961.
- Huang, Y., Reimann, J., Lepp, H., Drici, N. y Adelroth, P. (2008) Vectorial proton transfer coupled to reduction of O₂ and NO by a heme-copper oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 20257-20262.
- Huangyutitham, V., Güvener, Z.T. y Harwood, C.S. (2013) Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *MBio* **4**: e00242-00213.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Huo, Y.X., Tian, Z.X., Rappas, M., Wen, J., Chen, Y.C., You, C.H., Zhang, X., Buck, M., Wang, Y.P. y Kolb, A. (2006) Protein-induced DNA bending clarifies the architectural organization of the s⁵⁴-dependent glnAp2 promoter. *Mol Microbiol* **59**: 168-180.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S.M. y Pak, K. (2001) Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* **183**: 5589-5598.
- Hutchison, M.L., y Gross, D.C. (1997) Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 347-354.
- Huynh, T.V., Dahlbeck, D. y Staskawicz, B.J. (1989) Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* **245**: 1374-1377.
- Hu, S.Q., Gao, Y.G., Tajima, K., Sunagawa, N., Zhou, Y., Kawano, S., Fujiwara, T., Yoda, T., Shimura, D., Satoh, Y., Munekata, M., Tanaka, I. y Yao, M. (2010) Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17957-17961.
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiyama, T., Inagaki, Y., Toyoda, K. y Shiraishi, T. (2003) Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-defective mutants Δ *fliC* and Δ *fliD* in host tobacco plants. *J Gen Plant Pathol* **69**: 244-249.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A.N., Wozniak, D.J., Romeo, T. y Parsek, M.R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* posttranscriptional regulator RsmA represses biofilm extracellular polysaccharide Psl synthesis. *Mol Microbiol* **78**: 158-172.

Bibliografía

- Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R. y Wozniak, D.J. (2004) Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 4466–4475.
- Jarrell, K.F. y McBride, M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* **6**: 466-476.
- Jenal, U. (2004) Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol* **7**: 185-191.
- Jenal, U. y Malone, J. (2006) Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet* **40**: 385-407.
- Jiang, S.M., Wang, L. y Reeves, P.R. (2001) Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. *Infect Immun* **69**: 1244-1255.
- Jin, Q. y He, S.Y. (2001) Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* **294**: 2556-2558.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L. y He, S.Y. (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* **40**: 1129-1139.
- Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. y He, S.Y. (2003) Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes Infect* **5**: 301-310.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A. y Buell, C.R. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* **187**: 6488-6498.
- Johnson, D.S., Bai, L., Smith, B.Y., Patel, S.S. y Wang, M.D. (2007) Single-molecule studies reveal dynamics of DNA unwinding by the ring-shaped T7 helicase. *Cell* **129**: 1299-1309.
- Johnson, J.G., Murphy, C.N., Sippy, J., Johnson, T.J. y Clegg, S. (2011) Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **193**: 3453-3460.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Ahmad, I., Romeo, T., Romling, U. y Melefors, O. (2010) Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ Microbiol* **12**: 524-540.
- Jones, J.D.G. y Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jones, C.J., Ryder, C.R., Mann, E.E. y Wozniak, D.J. (2013) AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *J Bacteriol* **8**: 1637-1644.
- Jones, C.J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L.K., Xu, B., Limoli, D.H., Harrison, J.J., Parsek, M.R., White, P. y Wozniak, D.J. (2014) ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **10**: e1003984.
- Jyot, J., Dasgupta, N. y Ramphal, R. (2002) FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *J Bacteriol* **184**: 5251-5260.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. y Römling, U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616.
- Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M.G. y Alon, U. (2001) Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* **292**: 2080-2083.
- Kang, H. y Gross, D.C. (2005) Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5056-5065.
- Karaolis, D.K., Means, T.K., Yang, D., Takahashi, M., Yoshimura, T., Muraille, E., Philpott, D., Schroeder, J.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Talbot, B.G., Brouillette, E. y Malouin, F. (2007) Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J Immunol* **178**: 2171-2181.
- Karp, N.A., Kreil, D.P. y Lilley, K.S. (2004) Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **4**: 1421-1432.
- Kazemi-Pour, N., Condemine, G. y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004) The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics* **10**: 3177-3186.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B. y Murray, T.S. (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**: 1026-1043.

- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Micro* **8**: 634-644.
- Keith, R.C., Keith, L.M.W., Hernández-Guzmán, G., Uppalapati, S.R. y Bender, C.L. (2003) Alginate gene expression by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in host and non-host plants. *Microbiology* **149**: 1127-1138.
- Kemp, B.E. (2004) Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest* **113**: 182-184.
- Kim, J.J. y Sundin, G.W. (2000) Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 Nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability *in vitro* and *in planta*. *J Bacteriol* **182**: 6137-6144.
- Kim, Y.K. y McCarter, L.L. (2007) ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **189**: 4094-4107.
- Kirillina, O., Fetherston, J.D., Bobrov, A.G., Abney, J. y Perry, R.D. (2004) HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **54**: 75-88.
- Klebensberger, J., Lautenschlager, K., Bressler, D., Wingender, J. y Philipp, B. (2007) Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ Microbiol* **9**: 2247-2259.
- Klebensberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S. y Philipp, B. (2009) SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11**: 3073-3086.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F. y Kunkel, B.N. (2001) Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J* **5**: 509-522.
- Klose, K.E. y Mekalanos, J.J. (1998) Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol Microbiol* **28**: 501-520.
- Koster, M., Bitter, W. y Tommassen, J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 325-331.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. y Peterson, K.M. (1994) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. y Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M. y O'Toole, G.A. (2007) BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 8165-8178.
- Kulasekara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neely, A.N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F.M. y Lory, S. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2839-2844.
- Kumar, M. y Chatterji, D. (2008) Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **154**: 2942-2955.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. y Iino, T. (1990) Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 741-747.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagaert, S., Beliën, T. y Volckaert, G. (2009) Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin Cell Dev Biol* **9**: 1064-1073.
- Lai, T.H., Kumagai, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y. y Rikihisa, Y. (2008) *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic di-GMP in host-cell infection. *J Bacteriol* **191**: 693-700.
- Lan, L., Deng, X., Xiao, Y., Zhou, J.-M. y Tang, X. (2007) Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 682-696.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L. y McAdams, H.H. (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4632-4637.

Bibliografía

- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T.R., Molin, S. y Ullrich, M.S. (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* **152**: 2909-2918.
- Leduc, J.L. y Roberts, G.P. (2009) Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *J Bacteriol* **191**: 7121-7122.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. y Lory, S. (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**: 1474-1484.
- Lee, E.R., Baker, J.L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. y Breaker, R.R. (2010) An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**: 845-848.
- Lee, B., Schjerling, C.K., Kirkby, N., Hoffmann, N., Borup, R., Molin, S., Hoiby, N. y Ciofu, O. (2011) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates maintain the biofilm formation capacity and the gene expression profiles during the chronic lung infection of CF patients. *APMIS* **119**: 263-274.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R. y Jeffers, A.K. (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* **175**: 7512-7518.
- Leigh, J.A. y Coplin, D.L. (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annu Rev Microbiol* **46**: 307-346.
- Le Quere, B. y Ghigo, J.M. (2009) BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* **72**: 724-740.
- Levet-Paulo, M., Lazzaroni, J.C., Gilbert, C., Atlan, D., Doublet, P. y Vianney, A. (2011) The atypical two-component sensor kinase Lpl0330 from *Legionella pneumophila* controls the bifunctional diguanylate cyclase-phosphodiesterase Lpl0329 to modulate bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP synthesis. *J Biol Chem* **286**: 31136-31144.
- Li, T.N., Chin, K.H., Liu, J.H., Wang, A.H. y Chou, S.H. (2009) XC1028 from *Xanthomonas campestris* adopts a PiiZ domain-like structure without a c-di-GMP switch. *Proteins* **75**: 282-288.
- Li, X., Nielsen, L., Nolan, C. y Halverson, L.J. (2010) Transient alginate gene expression by *Pseudomonas putida* biofilm residents under water-limiting conditions reflects adaptation to the local environment. *Environ Microbiol* **12**: 1578-1590.
- Li, B., Li, N., Wang, F., Guo, L., Huang, Y., Liu, X., Wei, T., Zhu, D., Liu, C., Pan, H., Xu, S., Wang, H.W. y Gu, L. (2012) Structural insight of a concentration dependent mechanism by which YdiV inhibits *Escherichia coli* flagellum biogenesis and motility. *Nucleic Acids Res* **40**: 11073-11085.
- Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K. y Frankenberg-Dinkel, N. (2013) NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J Bacteriol* **195**: 3531-3542.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J. y Collmer, A. (2006) Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1151-1158.
- Lindeberg, M., Myers, C.R., Collmer, A. y Schneider, D.J. (2008) Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 685-700.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C. y Panopoulos, N.J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168**: 512-522.
- Lindow, S.E., Lahue, E., Govindarajan, A.G., Panopoulos, N.J. y Gies, D. (1989) Localization of ice nucleation activity and the iceC gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. *Mol Plant Microbe Interact* **2**: 262-272.
- Lindow, S.E. y Brandl, M.T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1875-1883.
- Lindström, K., Murwira, M., Willems, A. y Altier, N. (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* **161**: 453-463.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lizewski, S.E., Schurr, J.R., Jackson, D.W., Frisk, A., Carterson, A.J. y Schurr, M.J. (2004) Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis. *J Bacteriol* **186**: 5672-5684.
- Losada, L.C. y Hutcheson, S.W. (2005) Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol* **55**: 941-953.
- Lovering, A.L., Capeness, M.J., Lambert, C., Hopley, L. y Sockett, R.E. (2011) The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *MBio* **2**: 1-8.

- Ma, L., Jackson, K., Landry, R.M., Parsek, M.R. y Wozniak, D.J. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional Psl variants reveals roles for the Psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm postattachment. *J Bacteriol* **188**: 8213-8221.
- Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W. y Wood, T.K. (2011) Engineering a novelc-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environ Microbiol.* **13**:631-642.
- Macnab, R.M. (1999) The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J Bacteriol* **181**: 7149-7153.
- Macnab, R.M. (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**: 77-100.
- Macnab, R.M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **11**: 1-3.
- Mhlanga-Mutangadura, T., Morlin, G., Smith, A.L., Eisenstark, A. y Golomb, M. (1998) Evolution of the major pilus gene cluster of *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **180**: 4693-4703.
- Malone, J.G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A.J. y Rainey, P.B. (2007) The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* **153**: 980-994.
- Mahajan, A., Currie, C.G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., McNeilly, T.N., Roe, A., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Gally, D.L. y Smith, D.G. (2009) An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol* **11**: 121-137.
- Malone, J.G., Jaeger, T., Spangler, C., Ritz, D., Spang, A., Arrieumerlou, C., Kaeffer, V., Landmann, R. y Jenal U. (2010) YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **6**: e1000804.
- Mann, E.E. y Wozniak, D.J. (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 893-916.
- Martínez-Gil, M., Ramos-González, M.I. y Espinosa-Urgel, M. (2014) Roles of cyclic di-GMP and the Gac system in transcriptional control of the genes coding for the *Pseudomonas putida* adhesins LapA and LapF. *J Bacteriol* **196**: 1484-1495.
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R. y Martín, M. (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One* **7**: e31765.
- Massie, J.P., Reynolds, E.L., Koestler, B.J., Cong, J.P., Agostoni, M. y Waters, C.M. (2012) Quantification of high-specificity cyclic diguanylate signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **31**: 12746-12751.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., De Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M. y Ramos-González, M.I. (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**: 1842-1850.
- Matilla, M.A., Travieso, M.L., Ramos, J.L. y Ramos-Gonzalez, M.I. (2011) Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ Microbiol* **13**: 1745-1766.
- Matsukawa, M. y Greenberg, E.P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 4449-4456.
- Matthysse, A.G., Yarnall, H.A. y Young, N. (1996) Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **178**: 5302-5308.
- Matthysse, A.G. y McMahan, S. (1998) Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2341-2345.
- Mazur, O. y Zimmer, J. (2011) Apo- and cellopentaose-bound structures of the bacterial cellulose synthase subunit BcsZ. *J Biol Chem* **286**: 17601-17606.
- Mazzola, M., y White, F.F. (1994) A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. *J Bacteriol* **176**:1374-1382.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E. y Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**:114-122.
- Meissner, A., Wild, V., Simm, R., Rohde, M., Erck, C., Bredenbruch, F., Morr, M., Römling, U. y Häussler, S. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* *cupA* encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environ Microbiol* **9**: 2475-2485.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. y He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980.

Bibliografía

- Mendez-Ortiz, M.M., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Membrillo-Hernandez, J. (2006) Genome wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**: 8090-8099.
- Meneses, N., Mendoza-Hernández, G. y Encarnación, S. (2010) The extracellular proteome of *Rhizobium etli* CE3 in exponential and stationary growth phase. *Proteome Science* **8**: 51-61.
- Merino, S., Shaw, J.G. y Tomas, J.M. (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 127-135.
- Merighi, M., Lee, V.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. 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.
- Merril, C.R., Switzer, R.C. y Van Keuren, M.L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4335-4339.
- Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L., y O'Toole, A.G. (2007) SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J Bacteriol* **189**: 8154-8164.
- Mills, E., Pult, I., Kulasekara, H. y Miller, S. (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiology* **13**: 1122-1129.
- Minamino, T. y Macnab, R.M. (1999) Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* **181**: 1388-1394.
- Minamino, T. y Macnab, R.M. (2000) Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* **182**: 4906-4914.
- Minamino, T., Imada, K. y Namba, K. (2008) Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**: 1105-1115.
- Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S. y Wozniak, D.J. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell Microbiol* **14**: 95-106.
- Mitchell, J.G. y Kogure, K. (2006) Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 3-16.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangl, J.L. y Grant, S.R. (2007) Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **15**: 363-371.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H. y O'Toole, G.A. (2007) Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63**: 656-679.
- Monier, J.M. y Lindow, S.E. (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15977-15982.
- Monier, J.M. y Lindow, S.E. (2004) Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* **70**: 346-355.
- Morgan, J.L., Strumillo, J. y Zimmer, J. (2013) Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**: 181-186.
- Morgan, J.L., McNamara, J.T. y Zimmer, J. (2014) Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol* **5**: 489-496
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M. y Namba, K. (2006) The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol* **359**: 466-477.
- Morett, E. y Segovia, L. (1993) The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J Bacteriol* **175**: 6067-6074.
- Morris, J. y Gonzalez, J.E. (2009) The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **191**: 5890-5900.
- Morris, C.E., Monteil, C.L. y Berge, O. (2013) The life history of *Pseudomonas syringae*: Linking agriculture to earth system processes *Annu Rev Phytopathol* **51**: 85-104.
- Moscoso, J.A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P. y Filloux, A. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13**: 3128-3138.
- Mougel, C. y Zhulin, I.B. (2001) CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem Sci* **26**: 582-584.

- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. y Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**: 587-593.
- Murray, T.S. y Kazmierczak, B.I. (2006) FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**: 6995-7004.
- Napoli, C., Dazzo, F. y Hubbell, D. (1975) Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Appl Microbiol* **30**: 123-131.
- Nakhamchik, A., Wilde, C. y Rowe-Magnus, D.A. (2008) Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4199-4209.
- Naumoff, D.G. (2005) GH97 is a new family of glycoside hydrolases, which is related to the alpha-galactosidase superfamily. *BMC Genomics* **6**: 112.
- Navarro, M.V., De, N., Bae, N., Wang, Q. y Sondermann, H. (2009) Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure* **17**:1104-1116.
- Navarro, M.V., Newell, P.D., Krasteva, P.V., Chatterjee, D., Madden, D.R., O'Toole, G.A. y Sondermann, H. (2011) Structural basis for c-di-GMP mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol* **9**: 1104-1116.
- Nelson, K.E., Weinell, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., De Boy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Düsterhöft, A., Tümmler, B. y Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Nesper, J., Reinders, A., Glatter, T., Schmidt, A., Jenal, U. (2012) A novel capture compound for the identification and analysis of cyclic di-GMP binding proteins. *J Proteomics* **75**: 4874-4878.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. y Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**: 27-43.
- Newell, P.D., Monds, R.D. y O'Toole, G.A. (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 3461-3466.
- Newell, P.D., Yoshioka, S., Hvorecny, K.L., Monds, R.D. y O'Toole, G.A. (2011) Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* **193**: 4685-4698.
- Nikaido, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**: 119-146.
- Nishida, M., Harada, S., Noguchi, S., Satow, Y., Inoue, H. y Takahashi, K. (1998) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106. *J Mol Biol* **281**: 135-147.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. y Sugino, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* **18**: 6169.
- Nomura, K., Melotto, M. y He, S.Y. (2005) Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 361-368.
- Nottage, K., McFarlane, J., Krasin, M.J., Li, C., Srivastava, D., Robison, L.L. y Hudson, M.M. (2012) Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol* **30**: 2552-2558.
- O'Brien, H.E., Thakur, S. y Guttman, D.S. (2011) Evolution of Plant Pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: A Genomics Perspective. *Annu Rev Phytopathol* **49**:269-289.
- Oglesby, L.L., Jain, S. y Ohman, D.E. (2008) Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* **154**: 1605-1615.
- Ogunniyi, A.D., LeMessurier, K.S., Graham, R.M., Watt, J.M., Briles, D.E., Stroehner, U.H. y Paton, J.C. (2007) Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infect Immun* **75**: 1843-1851.
- Ogura, T. y Wilkinson, A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**: 575-597.
- Oldroyd, G.E. y Downie, J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 519-546.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J.W. y Beuzón, C.R. (2010) Negative regulation of the Hrp Type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 682-701.

Bibliografía

- Osborn, A.E. (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Osman, S.F., Fett, W.F. y Fishman, M.L. (1986) Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *J Bacteriol* **166**: 66-71.
- Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M.C. y Le, R.D. (1998) Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11394-11399.
- Österberg, S., Åberg, A., Herrera Seitz, M.K., Wolf-Watz, M. y Shingler, V. (2013) Genetic dissection of a motility-associated c-di-GMP signalling protein of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol Rep* **5**: 556-565.
- Ottemann, K.M. y Miller, J.F. (1997) Roles for motility in bacterial–host interactions. *Mol Microbiol* **24**: 1109-1117.
- O'Toole, G.A. y Kolter, R. (1998a) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- O'Toole, G.A y Kolter, R. (1998b) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Palleroni, N.J. Genus I *Pseudomonas* Migula (1984) In *The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R., y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams and Wilkins Co, pp. 141-199.
- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. y Jenal, U. (2004) Cell 40 cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**: 715-727.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F. y Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* **38**: 128-139.
- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Schneider, D.J., Cartinhour, S.W., Nelson, W.C., Weidman, J., Watkins, K., Tran, K., Khouri, H., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Thomashow, L.S. y Loper, J.E. (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* **23**: 873-878.
- Pedone, E., Limauro, D., D'Ambrosio, K., De, S.G. y Bartolucci, S. (2010) Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3797-3814.
- Peek, J.A. y Taylor, R.K. (1992) Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6210-6214.
- Pei, Z. y Blaser, M.J. (1993) PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem* **268**: 18717-18725.
- Peñaloza-Vazquez, A., Kidambi, S.P., Chakrabarty, A.M. y Bender, C.L. (1997) Characterization of the alginate biosynthetic gene cluster in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **179**: 4464-4472.
- Perego, M. y Hoch, J.A. (1996) Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends Genet* **12**: 97-101.
- Pérez-Mendoza, D., Coulthurst, S.J., Humphris, S., Campbell, E., Welch, M., Toth, I.K. y Salmond, G.P. (2011a) A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase. *Mol Microbiol* **82**: 719-733.
- Pérez-Mendoza, D., Coulthurst, S.J., Sanjuan, J. y Salmond, G.P. (2011b) N-Acetylglucosamine-dependent biofilm formation in *Pectobacterium atrosepticum* is cryptic and activated by elevated c-di-GMP levels. *Microbiology* **157**: 3340-3348.
- Pérez-Mendoza, D., Aragon, I., Prada-Ramírez, H., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M.T. y Sanjuan, J. (2014) Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS ONE* **9**: e91645.
- Perino, A., Ghigo, A., Scott, J.D. y Hirsch, E. (2012) Anchoring Proteins as Regulators of Signaling Pathways. *Circ Res* **4**: 482-492.
- Pesavento, C. y Henqge, R. (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr opin Microbiol* **2**: 170-176.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A. y Alfano, J.R. (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7652-7657.
- Piddock, L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.

- Pier, G.B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. y Ohman, D.E. (2001) Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* **69**: 1895-1901.
- Pitcher, R., Brittain, T. y Watmough, N. (2002) Cytochrome *cbb₃* oxidase and bacterial microaerobic metabolism. *Biochem Soc Trans* **30**: 653-658.
- Pitcher, R.S. y Watmough, N.J. (2004) The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1655**: 388-399.
- Podgornaia, A.I. y Laub, M.T. (2013) Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **16**: 156-162.
- Ponting, C.P., Schultz, J., Milpetz, F. y Bork, P. (1999) SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 229-232.
- Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**: 12-26.
- Popham, D.L., Szeto, D., Keener, J. y Kustu, S. (1989) Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**: 629-635.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H. y Armitage, J.P. (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153-165.
- Potrykus, K. y Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**: 35-51.
- Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D. y Camilli, A. (2007) PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **282**: 12860-12870.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thöny-Meyer, L., Appleby, C.A. y Hennecke, H. (1996) A high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol* **178**: 1532-1538.
- Preston, G., Deng, W.-L., Huang, H.C. y Collmer, A. (1998) Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* **180**: 4532-4537.
- Preston, G.M. (2000) *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol* **1**: 263-275.
- Pryor, E.E., Waligora, E.A., Xu, B., Ios-Nolan, S., Wozniak, D.J. y Hollis, T. (2012) The transcription factor AmrZ utilizes multiple DNA binding modes to recognize activator and repressor sequences of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *PLoS Pathog* **8**: e1002648.
- Pueyo, C., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Monje-Casas, F. y López-Barer, J. (2002) Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. In *Methods Enzymol.* Helmut, S. y Lester, P. (eds): Academic Press, pp.441-451.
- Qi, Y., Chuah, M.L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K. y Liang, Z.X. (2011) Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem* **286**: 2910-2917.
- Qi, Y., Xu, L., Dong, X., Yau, Y.H., Ho, C.L., Koh, S.L., Shochat, S.G., Chou, S.H., Tang, K. y Liang, Z.X. (2012) Functional divergence of FimX in PilZ binding and type IV pilus regulation. *J Bacteriol* **194**: 5922-5931.
- Quiñones, B., Dulla, G. y Lindow, S.E. (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 682-693.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., Möllby, R. (2007) The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar sobria strain. *FEMS Microbiol Lett* **273**: 172-179.
- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N. y Panopoulos, N.J. (1992) Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* **174**: 3499-3507.
- Ramos, A.R., Morello, J.E., Ravindran, S., Deng, W.L., Huang, H.C. y Collmer, A. (2007) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* **189**: 5773-5778.
- Ramelot, T.A., Yee, A., Cort, J.R., Semesi, A., Arrowsmith, C.H. y Kennedy, M.A. (2007) NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* **66**: 266-271.
- Ramphal, R. y Vishwanath, S. (1987) Why is *Pseudomonas* the colonizer and why does it persist? *Infection* **15**: 281-287.
- Ramsey, D.M. y Wozniak, D.J. (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**: 309-322.
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. y Liang, Z.X. (2008) Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**: 3622-3631.
- Rao, F., Qi, Y., Chong, H.S., Kotaka, M., Li, B., Li, J., Lescar, J., Tang, K. y Liang, Z.X. (2009) The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol* **191**: 4722-4731.

Bibliografía

- Rashid, M.H., Rajanna, C., Ali, A. y Karaolis, D.K. (2003) Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* **227**: 113-119.
- Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O. y Sauer, R.T. (1994) DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**: 754-757.
- Redondo-Nieto, M., Lloret, J., Larenas, J., Barahona, E., Navazo, A., Martínez-Granero, F., Capdevila, S., Rivilla, R. y Martín, M. (2008) Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **190**: 4106-4109.
- Rehman, Z.U., Wang Y., Moradali, M.F., Hay, I.D. y Rehm, B.H. (2013) Insights into the assembly of the alginate biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3264-3272.
- Reinert, D.J., Jank, T., Aktories, K. y Schulz, G.E. (2005) Structural basis for the function of *Clostridium difficile* toxin B. *J Mol Biol* **351**: 973-981.
- Reitzer, L.J. y Magasanik, B. (1986) Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**: 785-792.
- Rico, A. y Preston, G.M. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 269-282.
- Robertson, M., Hapca, S.M., Moshynets, O. y Spiers, A.J. (2012) Air-liquid interface biofilm formation by psychrotrophic pseudomonads recovered from spoiled meat. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1**: 251-259.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S. y Ruiz-Sainz, J.E. (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* **272**: 127-136.
- Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupová, J., Macho, A., Beuzón, C., Barón, M. y Ramos, C. (2008) Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth Res* **96**: 27-35.
- Roelofs, K.G., Wang, J., Sintim, H.O. y Lee, V.T. (2011) Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein metabolite interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 15528-15533.
- Rogers, M.B., Watkins, R.F., Harper, J.T., Durnford, D.G., Gray, M.W. y Keeling, P.J. (2007) A complex and punctate distribution of three eukaryotic genes derived by lateral gene transfer. *BMC Evol Biol* **7**: 89.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. y He, S.Y. (1997) Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3459-3464.
- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M. y Nunn, D.N. (1998) Characterization of Type IV Pilus Genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1048-1056.
- Romantschuk, M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Roine, E. y Suoniemi, A. (1993) Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of host and non-host plant leaves. *J Gen Microbiol* **139**: 2251-2260.
- Römmling, U. (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol* **153**: 205-212.
- Römmling, U. (2005) Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1234-1246.
- Römmling, U. y Amikam, D. (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr Opin Microbiol* **9**: 218-228.
- Römmling, U. (2009) Rationalizing the evolution of EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterases. *J Bacteriol* **191**: 4697-4700.
- Römmling, U. (2012) Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environ Microbiol* **14**: 1817-1829.
- Römmling, U., Galperin, M.Y. y Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 1-52.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., De, E., Van, G.A., Van, J.H. y Benziman, M. (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281.
- Ross, P., Mayer, R., Weinhouse, H., Amikam, D., Huggirat, Y., Benziman, M., Vroom, E., Fidder, A., Paus, P. y Sliedregt, L.A. (1990) The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. Chemical synthesis and biological activity of cyclic nucleotidedimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *J Biol Chem* **265**: 18933-18943.
- Ruffing, A.M. y Chen, R.R. (2012) Transcriptome profiling of a curdlan-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis *Microb Cell Fact* **11**: 17.

- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., Zhang, L.H., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P. y Dow, J.M. (2006a) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6712-6717.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F. y Dow, J.M. (2006b) Cyclic di-GMP signaling in bacteria: recent advances and new puzzles. *J Bacteriol* **188**: 8327-8334.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Jiang, B.L., He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L. y Dow, J.M. (2007) Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **63**: 429-442.
- Ryan, R.P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. y Dow, J.M. (2009) HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **11**: 1126-1136.
- Ryan, R.P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C.S., Armitage, J.P. y Dow, J.M. (2010a) Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 5989-5994.
- Ryan, R.P. y Dow, J.M. (2010b) Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in *Xanthomonas campestris*. *Virulence* **1**: 404-408.
- Ryan, R.P., McCarthy, Y., Kiely, P.A., O'Connor, R., Farah, C.S., Armitage, J.P. y Dow, J.M. (2012) Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in *Xanthomonas campestris*. *Mol. Microbiol* **86**: 557-567.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U. y Gomelsky, M. (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**: 30310-30314.
- Sabirova, J.S., Chernikova, T.N., Timmis, K.N. y Golyshin, P.N. (2008) Niche-specificity factors of a marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 89-96.
- Sarkar, S.F. y Guttman, D.S. (2004) Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1999-2012.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, C.A., Toledo, M.A., Trivella, D.B., Beloti, L.L., Schneider, D.R., Saraiva, A.M., Crucello, A., Azzoni, A.R., Souza, A.A., Aparicio, R. y Souza, A.P. (2012) Functional and structural studies of the disulfide isomerase DsbC from the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals a redox-dependent oligomeric modulation in vitro. *FEBS J* **279**: 3828-3843.
- Sasse-Dwight, S. y Gralla, J.D. (1988) Probing the *Escherichia coli* *glnALG* upstream activation mechanism in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8934-8938.
- Saxena, I.M., Kudlicka, K., Okuda, K. y Brown, R.M. (1994) Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (*acs* operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* **176**: 5735-5752.
- Saxena, I.M. y Brown, R.M. (1995) Identification of a second cellulose synthase gene (*acsAII*) in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* **177**: 5276-5283.
- Schafer, A., Tauch, W., Jager, J., Kalinowski, G., Thierbach, A., Puhler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *E. coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schild, S., Tamayo, R., Nelson, E.J., Qadri, F., Calderwood, S.B. y Camilli, A. (2007) Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell Host Microbe* **2**: 264-277.
- Schirmer, T. y Jenal, U. (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7**: 724-735.
- Schnider-Keel, U., Lejbolle, K.B., Baehler, E., Haas, D. y Keel, C. (2001) The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5683-5693.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G. y Kroppenstedt, R.M. (2005) Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* **166**: 589-594.
- Schubot, F.D., Cherry, S., Austin, B.P., Tropea, J.E. y Waugh, D.S. (2005) Crystal structure of the protease-resistant core domain of *Yersinia pestis* virulence factor YopR. *Protein Sci* **14**: 1679-1683.
- Schumacher, J., Joly, N., Rappas, M., Zhang, X. y Buck, M. (2006) Structures and organization of AAA+ enhancer binding proteins in transcriptional activation. *J Struct Biol* **156**: 190-199.

Bibliografía

Schwarzmann, S. y Boring, J.R. (1971) Antiphagocytic Effect of Slime from a Mucoid Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **3**: 762-767.

Seshasayee, A.S., Fraser, G.M. y Luscombe, N.M. (2010) Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* **38**: 5970-5981.

Shimizu, R., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiyama, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. y Ichinose, Y. (2003) The *Delta fliD* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol Genet Genomics* **269**: 21-30.

Shikuma, N.J., Fong, J.C. y Yildiz, F.H. (2012) Cellular levels and binding of c-di-GMP control subcellular localization and activity of the *Vibrio cholerae* transcriptional regulator VpsT. *PLoS Pathog* **8**: e1002719.

Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B. y Jackson, R.W. (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 652-680.

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

Simm, R., Fetherston, J.D., Kader, A., Römling, U. y Perry, R.D. (2005) Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. *J Bacteriol* **19**: 6816-6823.

Simm, R., Remminghorst, U., Ahmad, I., Zakikhany, K. y Römling, U. (2009) A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression y motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**: 3928-3937.

Simon, R., Priefer, U. y Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *BMC Biothechnol* **1**: 784-791.

Simpson, J.A., Smith, S.E. y Dean, R.T. (1993) Alginate may accumulate in cystic fibrosis lung because the enzymatic and free radical capacities of phagocytic cells are inadequate for its degradation. *Biochem Mol Biol Int* **30**: 1021-1034.

Simpson, J.A., Smith, S.E. y Dean, R.T. (1988) Alginate inhibition of the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages. *J Gen Microbiol* **134**: 29-36.

Simpson, J.A., Smith, S.E. y Dean, R.T. (1989) Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* **6**: 347-353.

Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C.E., Daniels, M.J. y Dow, J.M. (2000) A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38**: 986 -1003.

Smit, G., Puvanesarajah, V., Carlson, R.W., Barbour, W.M. y Stacey, G. (1992) *Bradyrhizobium japonicum* nod D1 can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *J Biol Chem* **267**: 310-318.

Smith, T.G. y Hoover, T.R. (2009) Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv Appl Microbiol* **67**: 257-295.

Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedroso, E. y Lasa, I. (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 7997-8002.

Soto, M.J., Dominguez-Ferreras, A., Perez-Mendoza, D., Sanjuan, J. y Olivares, J. (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**: 381-388.

Soto, M.J., Sanjuan, J. y Olivares, J. (2006) Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**: 3167-3174.

Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M. y Schmitt, R. (1998) Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223**: 283-290.

Spaank, H.P. (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**: 257-288.

Spiers, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Travisano, M. y Rainey, P.B. (2002) Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics* **161**: 33-46.

Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. y Rainey, P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **50**: 15-27.

Srivastava, D., Harris, R.C. y Waters, C.M. (2011) Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **193**: 6331-6341.

- Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B., Barnhart, D.M., Yoncheva, Y.N. y Slonczewski, J.L. (2002) pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 4246-4258.
- Standal, R., Iversen, T.G., Coucheron, D.H., Fjaervik, E., Blatny, J.M. y Valla, S. (1994) A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the *bcs* operon. *J Bacteriol* **176**: 665-672.
- Starkey, M., Hickman, J.H., Ma, L., Zhang, N., De, L.S., Hinz, A., Palacios, S., Manoil, C., Kirisits, M.J., Starnier, T.D., Wozniak, D.J., Harwood, C.S. y Parsek, M.R. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* rugose small colony variants have adaptations likely to promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* **191**: 3492-3503.
- Starnbach, M.N. y Lory, S. (1992) The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol Microbiol* **6**: 459-469.
- Steiner, S., Lori, C., Boehm, A. y Jenal, U. (2013) Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *EMBO J* **32**: 354-368.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warriner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Studholme, D.J. y Dixon, R. (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* **185**: 1757-1767.
- Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H. y Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Sundin, G.W. y Murillo, J. (1999) Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *rulAB* determinant intolerance to ultraviolet B (290–320 nm) radiation and distribution of *rulAB* among *P. syringae* pathovars. *Environ Microbiol* **1**: 75-87.
- Suoniemi, A., Björklöf, K., Haahtela, K. y Romantschuk, M. (1995) Pili of *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* enhance initiation of bacterial epiphytic colonization of bean. *Microbiology* **141**: 497-503.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R. y Romeo, T. (2006) Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* **20**: 2605-2617.
- 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. y 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. *J Bacteriol* **180**: 4416-4425.
- Talbi, C., Sanchez, C., Hidalgo-Garcia, A., Gonzalez, E.M., Arrese-Igor, C., Girard, L., Bedmar, E.J. y Delgado, M.J. (2012) Enhanced expression of *Rhizobium etli* *ccb3* oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. *J Exp Bot* **63**: 5035-5043.
- Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. y Landini, P. (2010) The diguanylate cyclase YddV controls production of the exopolysaccharide poly-N-acetylglucosamine (PNAG) through regulation of the PNAG biosynthetic *pgaABCD* operon. *Microbiology* **156**: 2901-2911.
- Tamayo, R., Pratt, J.T. y Camilli, A. (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**: 131-148.
- Tamayo, R. (2013) The characterization of a c-di-GMP pathway leads to a new tool for studying c-di-GMP metabolic genes. *J Bacteriol* **21**: 4779-4781.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D.A. y Gomelsky, M. (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**: 34751-34758.
- Tao, F., He, Y.W., Wu, D.H., Swarup, S. y Zhang, L.H. (2010) The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol* **192**: 1020-1029.
- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M. y Panopoulos, N.J. 2010. Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 347-370.
- Tart, A.H., Wolfgang, M.C. y Wozniak, D.J. (2005) The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J Bacteriol* **187**: 7955-7962.

Bibliografía

- Tart, A.H., Blanks, M.J. y Wozniak, D.J. (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* **188**: 6483-6489.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D.A. y Gomelsky, M. (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* **281**: 34751-34758.
- Teather R.M. y Wood P.J. (1982) Use of Congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* **43**: 777-780.
- Thakur, K.G., Praveena, T. y Gopal, B. (2010) Structural and biochemical bases for the redox sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* RslA. *J Mol Biol* **397**: 1199-1208.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.
- Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y. y Spormann, A.M. (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**: 2681-2691.
- Tischler, A.D. y Camilli, A. (2005) Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun* **73**: 5873-5882.
- Trimble, M.J. y McCarter, L.L. (2011) Bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP-linked quorum sensing controls swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 18079-18084.
- Toutain, C.M., Zegans, M.E. y O'Toole, G.A. (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 771-777.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A. y Saier, M.H. (1999) The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 107-125.
- Tschowri, N., Busse, S. y Hengge, R. (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**: 522-534.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G. y Van Melderen, L. (2006) Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol* **157**: 701-713.
- Tümmler, B., Wiehlmann, L., Klockgether, J. y Cramer, N. (2014) Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000 Prime Rep* **6**: 9.
- Turnbull, G.A., Morgan, J.A., Whipps, J.M. y Saunders, J.R. (2001). The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment and colonisation of wheat roots. *FEMS MicrobiolEcol* **36**: 21-31.
- Ude, S., Arnold, D.L., Moon, C.D., Timms-Wilson, T. y Spiers, A.J. (2006) Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ Microbiol* **8**: 1997-2011.
- Ueda, A. y Wood, T.K. (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog* **5**: e1000483.
- Ullrich, M., Penalzoza-Vazquez, A., Bailey, A.M. y Bender, C.L. (1995) A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J Bacteriol* **177**: 6160-6169.
- Underwood, W., Zhang, S. y He, S.Y. (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **4**: 658-672.
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T. y Jaeger, K.E. (2001) DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 587-596.
- Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., y Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 1207-1219.
- Vargas, P., Farias, G.A., Nogales, J. Prada, H., Carvajal, V. Barón, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A. y Gallegos, M.T. (2013) Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. *Environ Microbiol Rep* **5**: 841-850.
- Van, H.W., Higgins, C.F. y Konings, W.N. (2001) Multidrug transport by ATP binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine mechanism. *Res Microbiol* **152**: 365-374.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A. y Gelfand, M.S. (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet* **20**: 44-50.

- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B., Vacherie, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Lemaitre, B., Médigue, C. y Bocard, F. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**: 673-679.
- Vorholt, J.A. (2012) Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* **10**: 828-840.
- Wang, Y., Xu, J., Chen, A., Wang, Y., Zhu, J., Yu, G., Xu, L. y Luo, L. (2010) GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium melloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**: 410-417.
- Wadhams, G.H. y Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 1024-1037.
- Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U. y Schirmer, T. (2007) Structure of BeF3- -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15**: 915-927.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. y Hengge, R. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014 -1034.
- Wei, W., Plovianich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C. y He, S.Y. (2000) The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2247-2252.
- Wei, C.F., Deng, W.L. y Huang, H.C. (2005) A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV inregulation of the *Pseudomonas syringae* pv. syringae type III secretion system. *Mol Microbiol* **57**: 520-536.
- Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F., Sudarsan, N., Neph, S., Tompa, M., Ruzzo, W.L. y Breaker, R.R. (2007) Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res* **35**: 4809-4819.
- Whitney, J.C. y Howell, P.L. (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* **21**: 63-72.
- Wiggins, C.A. y Munro, S. (1998) Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7945-7950.
- Wilksch, J.J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C.E., Whitchurch, C.B., Schembri, M.A., Chuah, M.L., Liang, Z.X., Wijburg, O.L., Jenney, A.W., Lithgow, T. y Strugnell, R.A. (2011) MrkH, anovel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* **7**: e1002204.
- Willoughby, D. y Cooper, D.M. (2007) Organization and Ca²⁺ regulation of adenyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**: 965-1010.
- Winkler, W.C. y Breaker, R.R. (2005) Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol* **59**: 487-517.
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E.W. y Brinkman, F.S.L. (2009) *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: 483-488.
- Wolfe, A.J. y Visick, K.L. (2008) Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**: 463-475.
- Wood, P.J. (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research* **85**: 271-287.
- Wozniak, D.J., Sprinkle, B.A. y Baynham, P.J. (2003) Control of *Pseudomonas aeruginosa* algZ expression by the alternative sigma factor AlgT. *J Bacteriol* **185**: 7297-7300.
- Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S. y Hutcheson, S.W. (1992) Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. syringae 61 hrp cluster. *J Bacteriol* **174**: 1734-1741.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y. y Hutcheson, S.W. (1994) Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. syringae Pss61 hrp and hrmA genes. *J Bacteriol* **176**: 1025-1036.
- Xiao, Y. y Hutcheson, S.W. (1994) A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **176**: 3089-3091.
- Xie, H., Buschmann, S., Langer, J.D., Ludwig, B. y Michel, H. (2014) Biochemical and biophysical characterization of the two isoforms of cbb₃-type cytochrome c oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *J Bacteriol* **196**: 472-482.

Bibliografía

- Xin, X.F., y He, S.Y. (2013) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: A model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 473-498.
- Xu, J., Kim, J., Koestler, B.J., Choi, J.H., Waters, C.M. y Fuqua, C. (2013) Genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* unipolar polysaccharide production reveals complex integrated control of the motile-to-sessile switch. *Mol Microbiol* **89**: 929-948.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. y Harayama, S. (2000) Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146**: 2385-2394.
- Yang, J., Wilksch, J.J., Tan, J.W., Hocking, D.M., Webb, C.T., Lithgow, T., Robins-Browne, R.M. y Strugnell, R.A. (2013) Transcriptional activation of the *mrkA* promoter of the *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS One* **8**: e79038.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yan, H. y Chen, W. (2010) 3'-5'-Cyclic diguanylic acid: a small nucleotide that makes big impacts. *Chem Soc Rev* **39**: 2914-2924.
- Yi, X., Yamazaki, A., Biddle, E., Zeng, Q. y Yang, C.H. (2010) Genetic analysis of two phosphodiesterases reveals cyclic diguanylate regulation of virulence factors in *Dickeya dadantii*. *Mol Microbiol* **77**: 787-800.
- Yildiz, F.H. y Visick, K.L. (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol* **17**: 109-118.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001) A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 89-103.
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M.L. y Espinosa-Urgel, M. (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* **288**: 118-124.
- Yu, J., Penalzoza-Vazquez, A., Chakrabarty, A.M. y Bender, C.L. (1999) Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol* **33**: 712-720.
- Zielinski, N.A., Chakrabarty, A.M. y Berry, A. (1991) Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase. *J Biol Chem* **266**: 9754-9763.
- Zielinski, N.A., Maharaj, R., Roychoudhury, S., Danganan, C.E., Hendrickson, W. y Chakrabarty, A.M. (1992) Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: environmental regulation of the *algC* promoter. *J Bacteriol* **174**: 7680-7688.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C.L., Schaller, A., He, S.Y. y Howe GA. (2003) Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. tomato promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* **4**: 485-499.
- Zogaj, X., Nitz, M., Rohde, M., Bokranz, W. y Romling, U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.
- Zorraquino, V., Garcia, B., Latasa, C., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Lasa, I. y Solano, C. (2012) Coordinated c-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *J Bacteriol* **3**: 417-428.
- Zwiesler-Vollick, J., Plovanich-Jones, A.E., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B.N. y He, S.Y. 2002. Identification of novel hrp-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 genome. *Mol Microbiol* **45**: 1207-1218.

APÉNDICE

Tabla A.1. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos GGDEF de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia al nombre del ORF en el genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). Pto, *P. syringae* pv tomato; Pph, *P. syringae* pv phaseolicola; Psy, *P. syringae* pv. *syringae*; Pp, *P. putida*; Pfl, *P. fluorescens*; Pae, *P. aeruginosa*.

	Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos
	Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1
WspR	PSPTO_0304	PSPPH_0093	Psyr_0088	PP_0216	PFLU0183	PA0290
	PSPTO_0339	PSPPH_0255	Psyr_0266	PP_0129	PFLU0085	PA5487
	PSPTO_0505	PSPPH_4713	Psyr_4678	PP_0369	PFLU5608	-
	PSPTO_1004	PSPPH_0905	Psyr_0870	-	-	-
	PSPTO_1305	PSPPH_1193	Psyr_1125	PP_0798	PFLU0956	-
	PSPTO_1346	PSPPH_1229	Psyr_1157	-	-	-
	PSPTO_1499	PSPPH_3875	Psyr_1309	PP_1494	PFLU1225	PA3702
	PSPTO_1616	PSPPH_1489	Psyr_3763	-	PFLU4782	-
	PSPTO_1739	PSPPH_3673	Psyr_3653	-	PFLU4306	PA3177
	PSPTO_2313	PSPPH_2080	Psyr_2110	PP_2097	PFLU4600	-
	PSPTO_2591	PSPPH_2908	Psyr_2281	-	-	-
	PSPTO_2807	PSPPH_2692	Psyr_2535	-	-	-
	PSPTO_3243	PSPPH_2993	-	-	PFLU3699	-
	PSPTO_3796	-	Psyr_1684	-	-	-
	PSPTO_4784	-	-	-	PFLU2361	-
	PSPTO_4837	PSPPH_4420	Psyr_4377	PP_0563	PFLU0621	PP4843

Tabla A.2. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos EAL de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia al nombre del ORF en el genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). Pto, *P. syringae* pv tomato; Pph, *P. syringae* pv phaseolicola; Psy, *P. syringae* pv. *syringae*; Pp, *P. putida*; Pfl, *P. fluorescens*; Pae, *P. aeruginosa*.

	Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos
	Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1
	PSPTO_0236	PSPPH_5019	Psyr_0171	-	PFLU0263	-
	PSPTO_1483	PSPPH_1363	Psyr_1293	PP_3750	PFLU1106	PA3947

Tabla A.3. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos HD-GYP de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia al nombre del ORF en el genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). Pto, *P. syringae* pv tomato; Pph, *P. syringae* pv phaseolicola; Psy, *P. syringae* pv. *syringae*; Pp, *P. putida*; Pfl, *P. fluorescens*; Pae, *P. aeruginosa*.

Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos
Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1
PSPTO_1152	PSPPH_1043	Psyr_0994	-	-	-
PSPTO_1270	PSPPH_1156	Psyr_1090	PP_0979	PFLU1054	PA3832
PSPTO_2897	PSPPH_2482	Psyr_2701	-	-	-

Tabla A.4. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos GGDEF/EAL de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia al nombre del ORF en el genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). Pto, *P. syringae* pv tomato; Pph, *P. syringae* pv phaseolicola; Psy, *P. syringae* pv. *syringae*; Pp, *P. putida*; Pfl, *P. fluorescens*; Pae, *P. aeruginosa*.

Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos	
Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1	
	PSPTO_0114	PSPPH_0079	Psyr_0074	PP_5263	PFLU5960	PA5295
	PSPTO_0306	PSPPH_0091	Psyr_0086	PP_0218	PFLU0185	PA0285
	PSPTO_0406	PSPPH_4801	Psyr_4770	PP_0337	PFLU0458	PA5017
	PSPTO_0536	PSPPH_0618*	Psyr_4642	PP_0386	PFLU5593	PA0575
	PSPTO_1278	PSPPH_1166	Psyr_1098	-	-	-
	PSPTO_1348	-	Psyr_1159	-	-	-
	PSPTO_1737	PSPPH_3675	Psyr_3655	PP_1761	PFLU4308	PA0861
	PSPTO_2171	PSPPH_1950	Psyr_1981	PP_1983	PFLU4198	-
	PSPTO_2699	PSPPH_2590	Psyr_2432	-	-	-
MucR	PSPTO_2757	PSPPH_2644	Psyr_2486	PP_3581	PFLU2753	PA1727
	PSPTO_2907	PSPPH_2472	Psyr_2711	-	-	-
	PSPTO_3886	PSPPH_1586	Psyr_1598	PP_1718	PFLU2031	PA3258
NbdA	PSPTO_4106	PSPPH_1419	Psyr_3843	PP_1144	PFLU1349	PA3311
	PSPTO_4208	PSPPH_3939	Psyr_3942	-	PFLU1083	-
BifA	PSPTO_4365	PSPPH_4065	Psyr_4060	PP_0914	PFLU4858	PA4367
	PSPTO_4543	PSPPH_4247	Psyr_4221	-	-	-
MorA	PSPTO_4631	-	Psyr_4265	PP_0672	PFLU5329	PA4601
	PSPTO_5014	PSPPH_0499	Psyr_0509	PP_4959	PFLU5698	-
	PSPTO_A0034	PSPPH_A0029 PSPPH_A0099 PSPPH_3495	Psyr_2711	-	-	-

*truncada por un transposón (PSPPH_0617)

Tabla A.5. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos PilZ de Pto con otros miembros del género *Pseudomonas*. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente. Los ortólogos se localizan en la misma fila y su ausencia en una cepa se representa con un guión. Se incluye también el nombre de aquellas proteínas portadoras de dominios PilZ cuya función se conoce. Pto, *P. syringae* pv. tomato DC3000; Pph, *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A; Psy, *P. syringae* pv. syringae B728a; Pp, *P. putida* KT2440; Pfl, *P. fluorescens* SBW25; Pae, *P. aeruginosa* PAO1.

	Patógenas plantas			Beneficiosas plantas		Patógena humanos
	Pto DC3000	Pph 1448A	Psy B728a	Pp KT2440	Pfl SBW25	Pae PAO1
WssB	PSPTO_1027	-	-	PP_2635	PFLU0301	-
Alg44	PSPTO_1241	PSPPH_1116	Psyr_1061	PP_1286	PFLU0988	PA3542
YcgR	PSPTO_1923	PSPPH_3417	Psyr_3490	PP_4397	PFLU4738	PA3353
	PSPTO_2108	PSPPH_1858	Psyr_1903	PP_2153	PFLU1571	PA2989
	PSPTO_2116	PSPPH_1866	Psyr_1911	PP_2164	PFLU1582	PA2799
PilZ	PSPTO_3825	PSPPH_1648	Psyr_1654	-	-	PA2960
	PSPTO_4335	PSPPH_4037	Psyr_4027	PP_1364	PFLU4947	PA4324
	PSPTO_4639	PSPPH_4331	Psyr_4274	PP_4642	PFLU5334	PA4608

Tabla A6. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos GGDEF de Sme con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican los dominios exclusivos de la cepa *S. meliloti*1021; en verde, los dominios presentes en el género *Sinorhizobium* (grupo Ensifer); en gris los dominios presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae y en rojo los dominios presentes en miembros de otras familias del orden *Rhizobiales* (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). Sme, *S. meliloti* 1021; Smed, *S. medicae* WSM419; Sfd, *S. fredii* NGR234; Rle, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; Ret, *R. etli*CFN42; Mlo, *M. loti* MAFF303099; Bja, *B. japonicum* USDA110; Bra, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Mes, *Mesorhizobium* sp. BNC1; Atu, *A. tumefaciens* C58.

Sme 1021	Smed WSM419	Sfd NGR234	Rle 3841	Ret CFN42	Atu C58	Mlo MAFF303099	Bja USDA110
SMc01370	Smed_0926	NGR_c10800	RL1730	RHE_CH01633	Atu1297	mlI0859	blI5123
SMc01464	Smed_2046	NGR_c20800	-	-	-	-	-
SMc04015	Smed_2687	NGR_c28450	-	-	Atu3767	-	-
SMA2301	-	-	-	-	-	-	-
SM_b20389	Smed_3728	-	-	-	-	-	-
SM_b20523	-	-	-	-	-	-	-

Tabla A7. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos EAL de Sme con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican los dominios exclusivos de la cepa *S. meliloti*1021; en verde, los dominios presentes en el género *Sinorhizobium* (grupo Ensifer); en gris los dominios presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae y en rojo los dominios presentes en miembros de otras familias del orden *Rhizobiales* (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). Sme, *S. meliloti* 1021; Smed, *S. medicae* WSM419; Sfd, *S. fredii* NGR234; Rle, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; Ret, *R. etli*CFN42; Mlo, *M. loti* MAFF303099; Bja, *B. japonicum* USDA110; Bra, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Mes, *Mesorhizobium* sp. BNC1; Atu, *A. tumefaciens* C58.

Sme 1021	Smed WSM419	Sfd NGR234	Rle 3841	Ret CFN42	Atu C58	Mlo MAFF303099	Bja USDA110
SMA0369	-	-	-	-	-	-	-
SM_b21517	Smed_4347	NGR_b03430	-	-	-	-	-

Tabla A8. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos HD-GYP de Sme con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican los dominios exclusivos de la cepa *S. meliloti*1021; en verde, los dominios presentes en el género *Sinorhizobium* (grupo Ensifer); en gris los dominios presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae y en rojo los dominios presentes en miembros de otras familias del orden *Rhizobiales* (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). Sme, *S. meliloti* 1021; Smed, *S. medicae* WSM419; Sfd, *S. fredii* NGR234; Rle, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; Ret, *R. etli* CFN42; Mlo, *M. loti* MAFF303099; Bja, *B. japonicum* USDA110; Bra, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Mes, *Mesorhizobium* sp. BNC1; Atu, *A. tumefaciens* C58.

Sme	Smed	Sfd	Rle	Ret	Atu	Mlo	Bja
1021	WSM419	NGR234	3841	CFN42	C58	MAFF303099	USDA110
SMA0392	Smed_6313	-	-	-	-	-	-

Tabla A9. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos GGDEF/EAL de Sme con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente; – representa la ausencia de una proteína homóloga según la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/> a través de *gene cluster*). En amarillo se indican los dominios exclusivos de la cepa *S. meliloti*1021; en verde, los dominios presentes en el género *Sinorhizobium* (grupo Ensifer); en gris los dominios presentes en miembros de la familia Rhizobiaceae y en rojo los dominios presentes en miembros de otras familias del orden *Rhizobiales* (Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae). Sme, *S. meliloti* 1021; Smed, *S. medicae* WSM419; Sfd, *S. fredii* NGR234; Rle, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; Ret, *R. etli*CFN42; Mlo, *M. loti* MAFF303099; Bja, *B. japonicum* USDA110; Bra, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Mes, *Mesorhizobium* sp. BNC1; Atu, *A. tumefaciens* C58.

Sme	Smed	Sfd	Rle	Ret	Atu	Mlo	Bja
1021	WSM419	NGR234	3841	CFN42	C58	MAFF303099	USDA110
SMc00033	Smed_0567	NGR_c07040	RL1275	RHE_CH01140	Atu0826	-	-
SMc00038	Smed_0574	-	RL1290	-	-	-	-
SMc00074	Smed_0533	NGR_c5400	RL1059	RHE_CH00976	Atu0784	mll7513	-
SMc00887	Smed_0430	NGR_c04310	RL0912	RHE_CH00850	Atu0701	mlr4740	-
SMc00992	Smed_0472	NGR_c04750	-	-	-	-	-
SMc03141	Smed_2842	-	-	-	-	-	-
SMc03178	Smed_2805	NGR_c29670	-	-	-	-	-
SMc03942	Smed_2761	NGR_c29150	RL4139	RHE_CH03616	-	-	-
SMA0137	Smed_5153 ²	-	-	-	-	-	-
SMA1548	Smed_5113 ²	NGR_b08060	-	-	-	-	-
SM_b20447	Smed_3683 ¹	NGR_b17780	RL3088	RHE_CH02645	-	mll6708	-
SM_b20900	-	NGR_c24200	-	-	-	-	-

¹, codificada en el plásmido pSMED01; ², codificada en el plásmido pSMED02.

Tabla A.10. Análisis comparativo de las hipotéticas proteínas con motivos PiIZ de Sme con otros miembros del orden Rhizobiales. Los números que aparecen en la tabla hacen referencia a la ORF del genoma correspondiente. Los ortólogos se localizan en la misma fila y su ausencia en una cepa se representa con un guión. Sme, *S. meliloti* 1021; Smed, *S. medicae* WSM419; Sfd, *S. fredii* NGR234; Rle, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841; Ret, *R. etli* CFN42; Mlo, *M. loti* MAFF303099; Bja, *B. japonicum* USDA110; Bra, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; Mes, *Mesorhizobium* sp. BNC1; Atu, *A. tumefaciens* C58.

Sme 1021	Smed WSM419	Sfd NGR234	Rle 3841	Ret CFN42	Mlo MAFF303099	Bja USDA110	Bra ORS278	Mes BNC1	Atu C58
SMc00507	Smed_1493	NGR_c15160	-	-	-	-	-	-	-
SMc00999	Smed_1043	NGRc12500	RL2537	RHE02207	mll0185	blr5568	BRADO2958	Meso_1725	Atu8163