

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNDAMENTAL Y  
DE SISTEMAS**



**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y SISTEMAS**

**SIMBIÓTICOS**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Importancia del segundo mensajero c-di-GMP  
en la simbiosis rizobio-leguminosa**

**LORENA ROMERO JIMÉNEZ**

**2016**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Lorena Romero Jiménez

IBN: 978-84-9125-996-1

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44100>

# **Importancia del segundo mensajero c-di-GMP en la simbiosis rizobio-leguminosa**

Memoria que presenta la licenciada en Biología,  
Lorena Romero Jiménez para optar al título de doctor

Fdo. Lorena Romero Jiménez

VºBº de los directores de la tesis

Fdo. Juan Sanjuán Pinilla  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Profesor de Investigación del CSIC

Fdo. Daniel Pérez Mendoza  
Doctor en Biología  
Doctor contratado

**Granada 2016**



El doctorando Lorena Romero Jiménez y los directores de la tesis Juan Sanjuán Pinilla 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 a Mayo de 2016

Director/es de la Tesis:

Fdo.: Juan Sanjuán Pinilla

Fdo.: Daniel Pérez Mendoza

Doctorando

Fdo.: Lorena Romero Jiménez



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, gracias a una beca JAE-PRE concedida por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han sido expuestos en los siguientes congresos y publicaciones:

### **Congresos:**

Daniel Pérez Mendoza; Miguel A. Rodríguez-Carvajal; Lorena Romero-Jiménez; Gabriela de A. Farias, Javier Lloret, María Trinidad Gallegos; Juan Sanjuán.

Título: A novel mixed-linkage  $\beta$ -glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*

Nombre del congreso: International Symposium on c-di-GMP signaling in Bacteria

Ciudad de realización: Berlín (Alemania)

Fecha de realización: Marzo 2015

Lorena Romero-Jiménez; David Rodríguez Carbonell; Harold Alexis Prada Ramírez; María Trinidad Gallegos Fernández; Juan Sanjuán Pinilla; Daniel Pérez Mendoza

Título: Incorporación estable y expresión del gen de la diguanilato ciclasa PleD\* en el genoma de bacterias que interactúan con plantas

Nombre del congreso: II IBEMPA CONFERENCE

Ciudad de realización: Sevilla

Fecha de realización: Septiembre 2013

Harold Alexis Prada Ramírez; Daniel Pérez Mendoza; Lorena Romero-Jiménez; Isabel María Aragón Cortés; Cayo Juan Ramos Rodríguez; Juan Sanjuán Pinilla; María Trinidad Gallegos Fernández

Título: Respuesta a elevados niveles de c-di-GMP en bacterias que interactúan con planta de manera simbiótica y patogénica

Nombre del congreso: V Reunión Bianual del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología

Ciudad de realización: Girona

Fecha de realización: 2013

Pérez-Mendoza, D.; Aragón, I.M.; Prada-Ramírez, H.A.; Romero-Jiménez, L.; Ramos, C.; Gallegos, M.T.; Sanjuán, J.

Título: Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria

Nombre del congreso: Bacterial Networks (ESF-EMBO)

Ciudad de realización: Pulstok, Polonia

Fecha de celebración: 2013

Daniel Pérez Mendoza; Harold Alexis Prada Ramírez; Lorena Romero-Jiménez; María Trinidad Gallegos Fernández; Juan Sanjuán Pinilla.

Título: Papel del c-di-GMP en las interacciones planta-bacteria  
Nombre del congreso: IV Reunión Bianual del Grupo Especializado de Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología (SEM)  
Ciudad de realización: Tánger (Marruecos),  
Fecha de realización: 2011

**Publicaciones:**

**Pérez-Mendoza, D., Rodríguez-Carvajal, M. A., Romero-Jiménez, L., Farias Gde, A., Lloret, J., Gallegos, M. T. & Sanjuán, J. (2015).** Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E757-765.

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

**Romero-Jiménez, L., Rodríguez-Carbonell, D., Gallegos, M. T., Sanjuán, J. & Pérez-Mendoza, D. (2015).** Mini-Tn7 vectors for stable expression of diguanylate cyclase PleD\* in Gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* **15**, 190.

***A mis padres***

***A Antonio***



## **AGRADECIMIENTOS**

A pesar de que los agradecimientos se encuentran incluidos al principio de esta tesis doctoral, son los últimos párrafos que escribo, aunque no por ello menos importantes. Con los ojos vidriosos y una mezcla de sentimientos encontrados, espero recoger en estas líneas el profundo agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a que este sueño sea posible.

En primer lugar, a mis directores de tesis, los doctores Juan Sanjuán y Daniel Pérez. Ha sido un orgullo realizar esta tesis doctoral bajo vuestra dirección. A Juan quiero agradecerle la confianza depositada en mí, su ánimo, sus magníficas ideas y su dedicación durante estos cuatro años. A Daniel, quiero agradecerle su esfuerzo, sus palabras de apoyo en los malos momentos y el tiempo que ha dedicado a formarme no solo a nivel científico sino también personal. Eres mi modelo a seguir y te deseo lo mejor en el futuro. Gracias.

Igualmente quiero transmitir mi más sincero agradecimiento a Mari Trini, por sus interesantes aportaciones durante los seminarios y por los ánimos transmitidos en esta última etapa. A la Dra. M<sup>a</sup> José Soto, por permitirme entrar en su laboratorio los viernes, durante mi último año de licenciatura.

A las doctoras Susanne Häussler y Juliane Düvel por acogerme como una más en su laboratorio en Braunschweig. Gracias por sumergirme en la aventura de “cazar” efectores del c-di-GMP. También, quiero agradecer al Dr. Friedrich W. Herberg y a la Dra. Daniela Bertinetti por toda su ayuda y sus conocimientos aportados en interacciones biomoleculares.

A la Dra. Lourdes Girard (Maluye), por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme aprender nuevas técnicas. Gracias por tu amistad y tus consejos, hiciste que durante mi estancia en México me sintiera como en casa. Gracias.

Y por supuesto agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y aguantado cada día. A M<sup>a</sup> José Lorite, por tu infinita paciencia en el laboratorio, tus buenos consejos y por tu ayuda desinteresada con las proteínas y todos los experimentos de plantas. Además, te agradezco tu compañía en el labo 111 y tus ánimos para hacer que todo parezca más fácil. A Soco, por siempre estar dispuesta a echar una mano, gracias por ayudarme a contar los nódulos de judía. A Quina, que aunque ya no estés por aquí, gracias por todos tus consejos cuando estaba empezando. A Toñi, por tu ayuda

con las purificaciones y por contestar siempre con una sonrisa cuando he tenido alguna duda. A la Dra. Adela Olmedilla por su gran ayuda con los experimentos de microscopia.

Y como no, a todos mis compañeros zaidineros, mis compañeros de tupper, sin vosotros este trabajo se hubiera hecho más difícil. A David, por su apoyo técnico pero sobre todo por su calidad como persona y cercanía. A Lydia, Virgi y Nieves por escuchar mis quejas y mis alegrías y en definitiva por estar siempre cuando se las necesita. Espero nada ni nadie, merme esta amistad. A Rocío (¡si ya eres doctora!), mi compañera de tesis, gracias por todas las risas y abrazitos que me has sacado, gracias por acompañarme por caminar a mi lado estos años. A Paola, por siempre tener las palabras adecuadas para hacerme sentir bien, vales muchísimo. A los que ya están un poquito más lejos, Vivi, Carol y Harold, gracias por cruzaros en mi camino, donde habéis dejado una gran huella, ojala nuestros caminos se vuelvan a cruzar. A Juan Carlos y Manu, los sevillanos con más gracia que conozco, porque este poco tiempo ha sido suficiente para forjar una gran amistad. A Gabriela, por escucharme durante las tardes de escritura. A Claudia, Mary y Paolo, por vuestra ilusión en el trabajo.

A todas las personas que hicieron mi estancia en México una de las mejores experiencias de mi vida. En especial a mi Chudi, mi compañera de viajes y de baile, a la que nunca le podía decir un NO, sin ti la estancia hubiera sido más dura. A Chouhra, Diana, Alejandro, Tania, Paty, Susi, Alma, Mario, Bárbara, Paz, Fabiola y otras muchas personas que hicieron que México y España estuvieran un poquito más cerca.

A los compañeros en mis dos estancias alemanas, Agatha, Stephan, Sebastian, Klaus, Tanja, Oliver, Robin, Matthias, Karolin, Daniel, Sven, y alguno más, gracias por vuestra ayuda cuando lo necesité y por hacerme sentir una más del labo.

A mis amigas de la infancia Candela, Alba, María José, Otilia, Pili y Sandra, por hacer lo imposible para poder estar juntas. Sin nuestros cafés rápidos (que luego duran horas) este trabajo hubiera sido más difícil, gracias por preguntar mil veces: ¿Cómo vas? A mi alma gemela María, gracias por las quedadas nocturnas de los jueves, por escucharme, entenderme como nadie y darme fuerzas. A Antonio Luis, Carrillo y Tomy por ser de esas personas que aunque las veas poco parece que el tiempo no pasa.

En lo personal quiero agradecer a mis padres, por ser un ejemplo de esfuerzo y trabajo, gracias a vosotros estoy hoy aquí. En especial a mi madre, por cuidarme tanto,

por tus palabras de apoyo, por animarme a luchar por las cosas que me gustan. A mi hermana, que siento tan cerca aunque la distancia sea grande. A mi prima Pili, mi compañera, mi confidente, le agradezco infinitamente tenerme de “ocupa” en su casa y aguantar mis cambios de humor (que han sido muchos). A mi tía Carmela, por hacer mi estancia en Santa Fe más fácil. Y al resto de mi familia que han tenido que sufrir ratos de charlas científicas durante las comidas.

A Antonio, por tu apoyo, tu compañía y permanecer a mi lado tantos años. Por seguirme allá donde voy sin dudarlo ni un momento. No sé qué nos deparará el futuro, pero sí que tengo claro que: “DONDE SEA PERO CONTIGO”.



## SUMMARY

Biological Nitrogen Fixation (BNF) is a prokaryotic-exclusive, fundamental process by which the atmospheric molecular nitrogen is reduced to ammonia and made accessible to other organisms, particularly plants. Rhizobia are able to carry out BNF after establishing a symbiotic interaction with legume hosts. Root nodules are the visible expression of this symbiosis, and represent plant organs where specialized forms of the bacteria reduce molecular nitrogen at the expense of carbohydrates provided by the plant.

A permanent exchange of signals between plant and bacteria is necessary for the establishment of an efficient nitrogen-fixing symbiosis. These signals must be integrated by the bacteria to modify their lifestyles and coordinate the expression of essential determinants for colonization of the roots and infection of the nodules. The second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) is a key molecule for the transition between different lifestyles in bacteria. Since rhizobia undergo dramatic changes during their life cycles, from free-living to intimate interaction with their hosts, and back to free life, it seems reasonable that the second messenger c-di-GMP could play an important role in coordination of those changes.

The large number of c-di-GMP metabolizing (for synthesis and degradation) enzymes encoded in plant-associated bacterial genomes suggests likely functional redundancies, which usually hinder genetic approaches. Therefore, in a first approach we evaluated the effects of artificial increases of intracellular c-di-GMP levels in diverse plant-interacting bacteria, including the phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and several mutualistic rhizobia, *Rhizobium etli* CFN42, *R. leguminosarum* bv. viciae UPM791 and *Sinorhizobium meliloti* 8530. In all of them, elevated c-di-GMP contents resulted in reduction of motility, increased production of exopolysaccharides and enhanced biofilm formation. Regarding the interaction with the host legumes, we found some differences depending on the type of interaction and the symbiotic stage concerned. In the three symbiotic relationships evaluated, high c-di-GMP levels seem to favour the early stages since enhanced attachment to plant roots, but the symbiotic efficiency was negatively affected in some cases. The most affected association was the *R. etli*-*P. vulgaris* (common bean), and bean plants inoculated with

elevated c-di-GMP *R. etli* showed decreased number of nodules, less aerial biomass and reduced nitrogen contents.

The elevation of c-di-GMP intracellular contents was achieved by the overexpression of the diguanylate cyclase PleD\* from *Caulobacter crescentus* from the pJBpleD\* plasmid (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). However, the low stability of this pJBpleD\* was a serious experimental limitation when a selective pressure for the plasmid could not be applied, particularly *in planta*. This prompted us to construct a set of tools for the stable integration of the *pleD\** gene into the genomes of plant-interacting bacteria. The suitability of the new constructions, based on the Tn7 transposon properties, was demonstrated in all the above plant-interacting bacteria. The mini-Tn7pleD\* delivery vehicles allow increases of the intracellular c-di-GMP levels in a similar way as vector pJBpleD\*. However, mini-Tn7 constructs resulted far more stable in the absence of antibiotic pressure than the plasmid-based *pleD\** constructs. This high stability ensures experimental homogeneity in time and space with regard to enhancing c-di-GMP intracellular levels in bacteria of interest. Furthermore, we have also implemented a system based on the repressor/inductor LacI<sup>Q</sup>/IPTG, to modulate *pleD\** expression and intracellular c-di-GMP rises on demand.

EPS overproduction was one of the strongest and most visible responses to elevated c-di-GMP in all bacteria. At the time this thesis was started, cellulose was the only EPS known to be activated by c-di-GMP in rhizobia. We demonstrated that *R. etli* produces at least two c-di-GMP regulated EPS, cellulose and the cellulose-like EPS Mixed-Linkage  $\beta$ -Glucan (MLG), previously reported in *S. meliloti* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). With the help of bacterial mutants, we concluded that both EPS promote red stained colonies and fluorescence in medium added with the dyes Congo red (CR) and calcofluor, respectively, at high intracellular c-di-GMP levels. However under our experimental conditions, cellulose was the main EPS involved in *R. etli* adhesion to abiotic (polystyrene) and biotic surfaces (bean root), as well as biofilm formation.

Concerning the interaction with the host plant, overproduction of cellulose and MLG were not found responsible for the reduced symbiotic efficiency observed in plants inoculated with high c-di-GMP strains, since mutants lacking both EPS still formed impaired symbiosis under these conditions. Microscopy studies indicated that nodules formed by high c-di-GMP bacteria have an altered infection pattern, with a

smaller number of infected cells, which could explain the reduced symbiotic efficiency. Far from restoring this defect, mutants unable to produce both cellulose and MLG displayed an even more drastic phenotype, with plant cells distributed in sectors within the nodule, indicative of altered infection thread growth or ramification. This result suggests putative roles of cellulose and/or MLG during nodule infection.

The impact of c-di-GMP on the transcriptome of *R. etli* was also investigated with the use of *microarrays*. Under the conditions tested, high c-di-GMP determined mainly downregulation of a relatively small number of genes, which did not allow reaching clear conclusions about additional functions affected by high c-di-GMP levels.

In plant-interacting bacterial genomes, the number of genes encoding putative c-di-GMP metabolizing enzymes (diguanylate cyclases and phosphodiesterases) is rather high. This contrasts with the reduced number of predicted c-di-GMP binding proteins, which suggests that most c-di-GMP effectors are yet to be identified. In order to identify new c-di-GMP binding proteins in *R. etli*, we followed a novel chemical proteomics approach which combines affinity chromatography with a c-di-GMP analogue (2'-AHC-c-di-GMP) and subsequent mass spectrometry (Düvel *et al.*, 2012). We identified 66 putative c-di-GMP binding proteins. Following a second screening based on putative protein function and domain composition, nine of those proteins were overexpressed in *E. coli* and tested for binding to a c-di-GMP fluorescent analogue (2'-Fluo-AHC-c-di-GMP). Dgt and GlmU proteins both gave positive signals, although they do not harbour any known c-di-GMP binding motif. To corroborate binding, we used other methodologies more sensitive and accurate, such as fluorescence polarization (FP). However, after protein purification Dgt did not show any interaction with the fluorescent analogue. GlmU interacted specifically with the 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP but not with other nucleotide fluorescent analogues. The  $K_D$  value of this interaction was determined to be  $2.37 \pm 0.32 \mu\text{M}$ . However, a competition assay with free, unmodified c-di-GMP, did not result in significant fluorescent signal reduction. Finally, we performed an isothermal titration calorimetry (ITC) assay for GlmU, which was also inconclusive. Therefore, despite the many efforts, we were not able to validate GlmU as a c-di-GMP binding protein.

This thesis represents one of the first dedicated studies on c-di-GMP regulation in rhizobia. Whereas other laboratories have followed mainly genetic approaches (Wang *et*

*al.* 2010; Gao *et al.* 2014; Schäper *et al.* 2016), here we have used an alternative approach based on the artificial alteration of c-di-GMP contents and the observation of phenotypical changes, to discern important processes regulated by this second messenger. Also different to other groups, we have evidenced that c-di-GMP regulates important properties of rhizobia for the symbiotic interaction with legumes.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

### **INTRODUCCIÓN**

<b>I. Simbiosis rizobio-leguminosa .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aspectos relevantes de la interacción <i>Rhizobium etli</i> -<i>Phaseolus vulgaris</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>II. El c-di-GMP como segundo mensajero.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Biosíntesis y degradación del c-di-GMP .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Diguanilato ciclasas (DGC).....	11
2.1.2. Fosfodiesterasas (PDE).....	14
2.1.3. Dominios sensores en proteínas DGC y PDE .....	15
<b>2.2. Moléculas efectoras.....</b>	<b>17</b>
2.2.1. Proteínas con dominios PilZ.....	17
2.2.2. Dominios DGC y PDE degenerados .....	20
2.2.3. Factores de transcripción .....	20
2.2.4. Riboswitches.....	23
2.2.5. Otros efectores del c-di-GMP .....	24
<b>III. Funciones celulares reguladas por c-di-GMP.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Motilidad bacteriana .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Exopolisacáridos regulados por c-di-GMP.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Celulosa .....	29
3.2.2. Alginatos.....	31
3.2.3. Psl y Pel .....	32
3.2.4. Poli- $\beta$ -1,6-N-acetil-glucosamina (PNAG).....	32
3.2.5. Exopolisacárido unipolar (UPP).....	33
3.2.6. $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) .....	35
3.2.7. Curdlan .....	35
3.2.8. Xantano.....	36
3.2.9. VPS.....	37
3.2.9. EPS de <i>Listeria</i> .....	37
<b>3.3. Formación de biopelículas.....</b>	<b>37</b>
<b>IV. Señalización por c-di-GMP en bacterias que interaccionan con plantas .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Papel del c-di-GMP en la simbiosis rizobio-leguminosa .....</b>	<b>45</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>I. Técnicas microbiológicas .....</b>	<b>55</b>
<b>1.1. Cepas bacterianas y plásmidos .....</b>	<b>55</b>
<b>1.2. Medios de cultivo .....</b>	<b>59</b>

1.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas</i> .....	59
1.2.2. Medios de cultivo para <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> .....	59
<b>1.3. Antibióticos.....</b>	<b>62</b>
<b>1.4. Conservación de cepas bacterianas .....</b>	<b>62</b>
<b>1.5. Conjugaciones biparentales o triparentales .....</b>	<b>62</b>
<b>1.6. Ensayos de motilidad <i>swimming</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>1.7. Ensayos de motilidad tipo <i>swarming</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>1.8. Ensayos de formación de biopelículas.....</b>	<b>63</b>
<b>1.9. Determinación de la producción de exopolisacáridos mediante tinción con rojo Congo y calcoflúor .....</b>	<b>64</b>
1.9.1. Producción de exopolisacáridos sobre medio sólido.....	64
1.9.2. Cuantificación de la producción de exopolisacáridos en medio líquido. ....	65
<b>II. Técnicas de biología molecular .....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. Aislamiento de ADN plasmídico .....</b>	<b>65</b>
2.1.1. Minipreparación mediante lisis alcalina .....	65
2.1.2. Minipreparación de ADN plasmídico con el kit.....	67
<b>2.2. Aislamiento de ADN genómico total .....</b>	<b>68</b>
<b>2.3. Determinación de la concentración de ADN .....</b>	<b>68</b>
<b>2.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción .....</b>	<b>69</b>
<b>2.5. Electroforesis en geles de agarosa .....</b>	<b>69</b>
<b>2.6. Revelado de geles y fotografía.....</b>	<b>69</b>
<b>2.7. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción.....</b>	<b>69</b>
<b>2.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa con cristal violeta (CV) .....</b>	<b>70</b>
<b>2.9. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.....</b>	<b>71</b>
<b>2.10. Amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa ....</b>	<b>71</b>
<b>2.11. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>2.12. Transformación bacteriana .....</b>	<b>72</b>
<b>2.13. Secuenciación de ADN de doble cadena .....</b>	<b>73</b>
<b>2.14. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas .....</b>	<b>73</b>
<b>2.15. Hibridación ADN-ADN (<i>Southern blotting</i>) .....</b>	<b>73</b>

2.15.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon.....	73
2.15.2. Preparación de sondas de ADN no radioactivas.....	74
2.15.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radiactivas.....	75
<b>2.16. Aislamiento de ARN total.....</b>	<b>76</b>
<b>2.17. Experimentos con <i>microarrays</i>.....</b>	<b>78</b>
2.17.1. Crecimiento de las bacterias.....	78
2.17.2. Reversotranscripción del ARN.....	78
2.17.3. Purificación del ADNc marcado.....	79
2.17.4. Pretratamiento del <i>microarray</i> .....	79
2.17.5. Hibridación del <i>microarray</i> .....	79
2.17.6. Procesamiento del <i>microarray</i> tras la hibridación y análisis de datos.....	80
<b>2.18. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR).....</b>	<b>80</b>
2.18.1. Síntesis de ADNc. Reacción de reverso transcripción del ARN.....	80
2.18.2. Reacción de amplificación (qRT-PCR).....	81
2.18.3. Medida de la eficiencia de los oligonucleótidos.....	
2.18.4. Cálculo de las expresiones relativas.....	82
<b>2.19. Extracción y medida de los niveles intracelulares de c-di-GMP.....</b>	<b>83</b>
2.19.1. Análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (MS/MS).....	83
<b>2.20. Análisis y purificación de proteínas.....</b>	<b>84</b>
2.20.1 Metodología para la sobreexpresión de proteínas.....	84
2.20.2. Electroforesis de proteínas desnaturizante (SDS-PAGE).....	85
2.20.3. Purificación de proteínas.....	87
<b>2.21. Determinación de proteínas totales.....</b>	<b>88</b>
<b>2.22. Purificación del MLG.....</b>	<b>89</b>
<b>III. Técnicas analíticas.....</b>	<b>89</b>
<b>3.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....</b>	<b>89</b>
<b>3.2. Cromatografía para la identificación de nuevas proteínas efectoras capaces de unir c-di-GMP.....</b>	<b>90</b>
3.2.1. <i>Dot blot</i> .....	91
<b>3.3. Fluorescencia polarizada (FP).....</b>	<b>92</b>
3.3.1. Ensayo directo.....	93
3.3.2. Ensayo competitivo.....	93
<b>3.4. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....</b>	<b>93</b>
<b>IV. Ensayos con plantas.....</b>	<b>94</b>
<b>4.1. Esterilización y germinación de semillas.....</b>	<b>94</b>

4.2. Solución nutritiva.....	94
4.3. Medida de la eficiencia simbiótica.....	95
4.4. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7 <i>in planta</i> .....	96
4.5. Adhesión a raíces .....	96
V. Técnicas microscópicas.....	97
5.1. Microscopia óptica para la observación de bacteroides.....	97
5.2. Microscopia óptica para la observación de nódulos de judía .....	97

## RESULTADOS

### CAPÍTULO 1. Impacto de elevados niveles del segundo mensajero c-di-GMP en bacterias que interactúan con plantas..... 101

#### 1.1. Uso de la construcción pJBpleD\* para incrementar los niveles intracelulares de c-di-GMP en bacterias..... 101

1.1.1. Aumento artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP y su cuantificación.....	102
1.1.2. Impacto de elevados niveles de c-di-GMP en bacterias en vida libre.....	103
1.1.3. Impacto de elevados niveles intracelulares de c-di-GMP en la interacción rizobio-leguminosa .....	107
1.1.4. Estabilidad de la construcción pJBpleD* .....	111

#### 1.2. Incorporación estable y expresión del gen de la diguanilato ciclasa PleD\* en el genoma de bacterias que interactúan con plantas. .... 114

1.2.1. El transposón Tn7.....	115
1.2.2. Construcción e introducción en el genoma de vectores mini-Tn7 portadores del gen <i>pleD*</i> .....	116
1.2.3. Comprobación de las inserciones mini-Tn7 .....	119
1.2.4. Identificación de eventos de transposición asociados al gen <i>glnS</i> en <i>Sinorhizobium meliloti</i> 8530.....	121
1.2.5. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP en los transposantes mini-Tn7. ....	122
1.2.6. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7pleD* vs. pJBpleD* en bacterias en vida libre .....	124
1.2.7. Impacto de los altos niveles de c-di-GMP en vida libre.....	125
1.2.8. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7pleD* <i>in planta</i> .....	129
1.2.9. Impacto de las construcciones mini-Tn7pleD* vs. pJBpleD* en la interacción rizobio-leguminosa. ....	131
1.2.10. Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la producción de factores Nod de <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (Ret).....	134

#### 1.3. Construcción de un sistema modulador de la expresión de *pleD\** en las cepas mini-Tn7..... 136

1.3.1. Expresión relativa de <i>pleD*</i> bajo el control del sistema LacI <sup>q</sup> -IPTG.....	137
1.3.2. Niveles de c-di-GMP bajo el control del sistema LacI <sup>q</sup> -IPTG .....	137

1.3.3. Producción de exopolisacáridos bajo el control del sistema LacI <sup>q</sup> -IPTG ..	139
<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO I .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO I.....</b>	<b>147</b>
<b>CAPITULO 2. Papel de la celulosa y glucano de enlaces mixtos en <i>Rhizobium etli</i> CFN42: formación de biopelículas e interacción con su hospedador .....</b>	<b>151</b>
<b>2.1. Exopolisacáridos regulados por c-di-GMP en <i>Rhizobium etli</i> CFN42 .....</b>	<b>151</b>
2.1.1 Polisacárido unipolar (UPP) o glucomanano. ....	152
2.1.2 Celulosa .....	153
2.1.3 $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) .....	154
<b>2.2. Obtención y caracterización de mutantes en los polisacáridos celulosa y MLG de <i>Rhizobium etli</i> CFN42 (Ret).....</b>	<b>157</b>
2.2.1 Obtención de mutantes en las glicosiltransferasas CelAB y BgsA. ....	157
2.2.2. Caracterización fenotípica de mutantes en la producción de celulosa y MLG bajo niveles fisiológicos y elevados de c-di-GMP .....	158
<b>2.3. Impacto del c-di-GMP en el transcriptoma de <i>Rhizobium etli</i> CFN42 .....</b>	<b>168</b>
<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO II.....</b>	<b>177</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO II.....</b>	<b>184</b>
<b>CAPÍTULO 3. Identificación y caracterización de proteínas de <i>Rhizobium etli</i> CFN42 capaces de unir c-di-GMP .....</b>	<b>189</b>
<b>3.1. Metodologías para la identificación de efectores celulares de c-di-GMP ..</b>	<b>190</b>
3.1.1. Cromatografía de afinidad: análogo del c-di-GMP acoplado a sefarosa....	191
3.1.2. Cromatografía de afinidad: Compuesto trifuncional .....	191
3.1.3. Rastreo de proteínas efectoras mediante DRaCALA .....	192
<b>3.2. Cromatografía de afinidad para la búsqueda de nuevos efectores que unan c-di-GMP en <i>Rhizobium etli</i> CFN42.....</b>	<b>193</b>
3.2.1. Estudio detallado de proteínas candidatas a efectores del c-di-GMP.....	200
<b>3.3. Sobreexpresión en <i>E. coli</i> de posibles proteínas efectoras de <i>R. etli</i>.....</b>	<b>205</b>
3.3.1. Ensayos de <i>dot blot</i> de las proteínas GlmU y Dgt purificadas .....	209
3.3.2. Estudio detallado de las proteínas Dgt y GlmU .....	212
<b>3.4. Caracterización de las proteínas Dgt y GlmU mediante fluorescencia polarizada (FP) .....</b>	<b>214</b>
3.4.1. Fundamento de la fluorescencia polarizada (FP). ....	214
3.4.2. Ensayos de fluorescencia polarizada con Dgt y GlmU .....	215
<b>3.5. Calorimetría de titulación isotérmica .....</b>	<b>222</b>
<b>DISCUSIÓN CAPÍTULO 3.....</b>	<b>225</b>
<b>ANEXOS CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>232</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>241</b>



# **INTRODUCCIÓN**



---

## **I. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA**

El nitrógeno en su forma molecular ( $N_2$ ) es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera, sin embargo, en esta forma es un gas inerte y no utilizable por la mayoría de seres vivos. Para poder ser incorporado a los sistemas biológicos, el  $N_2$  ha de ser químicamente reducido. La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la biosfera, por el que el  $N_2$  es reducido hasta amonio, asimilable por las plantas y otros organismos. Solo algunos procariontes y archeas, que poseen la enzima nitrogenasa, son capaces de fijar el gas  $N_2$ . Se calcula que unos 140 Tg de nitrógeno son incorporadas anualmente a los sistemas terrestres mediante FBN (Herridge *et al.*, 2008). Por otra parte, los fertilizantes nitrogenados son fabricados aprovechando la reacción de Haber-Bosch, un proceso que reduce el  $N_2$  a amonio empleando elevadas temperaturas (500° C) y presiones, por lo que su producción supone un gran consumo de combustibles fósiles. Debido a la movilidad y solubilidad de los compuestos nitrogenados, el empleo masivo de este tipo de fertilizantes constituye un riesgo de contaminación y eutrofización de ríos y acuíferos, además de incrementar la acidificación global y la pérdida de ozono estratosférico (Olivares *et al.*, 2013). Esto pone de manifiesto la importancia económica y ecológica del proceso de FBN, pues facilita la agricultura sostenible disminuyendo las necesidades de fertilizantes nitrogenados.

El proceso de FBN es llevado a cabo exclusivamente por procariontes, tanto Archeas como Eubacterias (Zehr *et al.*, 2003). Los microorganismos fijadores de nitrógeno se pueden encontrar en vida libre, asociados a plantas o estableciendo interacciones mutualistas con plantas, en particular las de la familia *Leguminosae*, uno de los grupos vegetales más diversos y de mayor importancia agronómica, alimentaria y ecológica (Olivares *et al.*, 2013). Las principales bacterias que llevan a cabo este proceso en asociación con plantas son los conocidos como rizobios, un grupo bacteriano heterogéneo que incluye multitud de géneros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -Proteobacterias como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Devosia*, etc., entre otros. Las interacciones entre los rizobios y las leguminosas suelen ser muy específicas. Sin embargo, en ocasiones no existe un grado de especificidad tan marcado, así *Sinorhizobium* sp. NGR234 lleva a

## Introducción

---

cabo interacciones exitosas con más de 100 géneros de leguminosas diferentes (Romero & Brom, 2004).

Los rizobios son bacilos Gram-negativos, móviles, no esporulados presentes en los suelos. La expresión visible de la simbiosis rizobio-leguminosa son los nódulos, verdaderos órganos fijadores de nitrógeno, generalmente localizados en las raíces de las leguminosas. No obstante, para el establecimiento de una simbiosis efectiva es necesario un continuo y adecuado intercambio de señales, así como la coordinación de respuestas fisiológicas entre la bacteria y la planta, en lo que constituye un auténtico diálogo molecular (Fig. I.1A).

Previo a este diálogo molecular entre ambos simbioses, tiene lugar la unión de la bacteria a los pelos radicales de la planta (Fig. I.1B). En un primer lugar se establece una unión débil, para posteriormente pasar a una unión más firme. En esta etapa, juegan un papel importante las adhesinas secretadas por la bacteria y ciertos exopolisacáridos como la celulosa (Dazzo *et al.*, 1984; Smit *et al.*, 1987).

Se conocen al menos tres grupos de señales que son intercambiadas y que deben de ser reconocidas de forma específica entre ambos simbioses (Oldroyd & Downie, 2008). En primer lugar, los rizobios son capaces de reconocer pequeñas moléculas exudadas por las plantas conocidas como flavonoides, las cuales activan la expresión de los genes de nodulación bacterianos (*nod*, *nol*, *noe*) (Viprey *et al.*, 2000). Estos genes son los encargados de la síntesis del segundo grupo de señales intercambiadas, los factores de nodulación (factores Nod). Los factores Nod tienen una estructura común en las diferentes especies de rizobios. Constan de un esqueleto oligosacárido de 4 o 5 residuos de N-acetil-glucosamina, en el que el azúcar del extremo no reductor está esterificado con un ácido graso. Los factores Nod presentan una serie de variaciones entre las distintas especies de rizobios que pueden afectar a la longitud, el grado de saturación del ácido graso o a la presencia de distintos grupos como acetilo, metilo, carbamoilo, fucosil, etc., tanto en los extremos reductor y no reductor del oligosacárido (Bladergroen & Spaink, 1998; Schultze & Kondorosi, 1998). Cada especie o cepa bacteriana produce varios tipos de factores Nod que son reconocidos específicamente por el o los hospedadores compatibles de esa bacteria. De esta forma, los factores Nod son el mayor determinante de especificidad en la simbiosis rizobio-leguminosa (Perret *et al.*, 2000). No obstante, existen algunas simbiosis que no son mediadas por factores

---

Nod, conocidas como Nod-independientes, sin que se conozca por el momento los compuestos mediadores de la especificidad (Okazaki *et al.*, 2016).

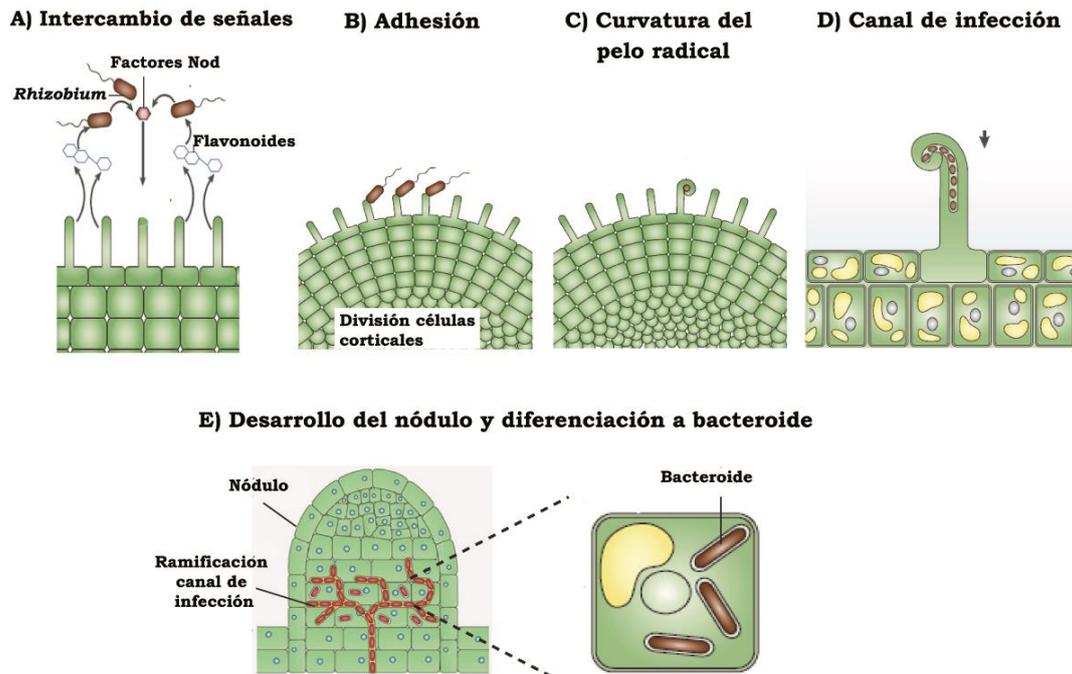
Tras su reconocimiento por las células de la raíz, los factores Nod activan múltiples respuestas en la planta hospedadora, como la curvatura de los pelos radicales o la formación de focos meristemáticos en el córtex, respuestas encaminadas a preparar la formación del nódulo y su invasión por las bacterias (Fig. I.1) (Jones *et al.*, 2007). En respuesta a los factores Nod, los pelos radicales cambian la dirección del crecimiento, curvándose en su extremo y formando un bolsillo (en forma de cayado de pastor) en el que quedan atrapadas las bacterias, que iniciarán la infección del pelo radical (Fig. I.1C). No obstante, existe otras formas de infección no asociadas a pelos radicales, en que las bacterias invaden la raíz aprovechando heridas (*crack entry*) o espacios intercelulares (Goormachtig *et al.*, 2004). Además, de forma simultánea a la infección comienzan a dividirse activamente algunas células del córtex dando lugar a una pequeña protuberancia que se denomina primordio nodular (Viprey *et al.*, 2000).

El tercer grupo de señales son los polisacáridos de superficie de la bacteria. Los rizobios pueden sintetizar diferentes polisacáridos como lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares (CPS), glucanos cíclicos (GC) y otros exopolisacáridos (EPS) más laxamente asociados a la superficie celular. Muchos de estos polisacáridos son necesarios para la colonización de la raíz, evitar las respuestas defensivas de la planta y el desarrollo adecuado de los nódulos (Skorupska *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito el papel señalizador que juegan algunos de los EPS, permitiendo la infección en hospedadores compatibles o induciendo reacciones defensivas en hospedadores no compatibles (Kawaharada *et al.*, 2015).

En muchas simbiosis los rizobios penetran a través de la pared celular del pelo radical, formándose una estructura tubular conocida como canal de infección, que progresa desde la zona de curvatura hacia la base del pelo radical. El crecimiento dirigido del canal de infección transporta a los rizobios hasta el primordio nodular. Una vez allí los canales de infección se ramifican y las bacterias son liberadas en el citoplasma de las células del primordio, en un proceso similar a la endocitosis, por el que las bacterias van a quedar rodeadas de una porción de membrana de la célula vegetal, denominada membrana peribacteroidal. Grupos de una o pocas bacterias rodeadas de membrana peribacteroidal constituye los simbiosomas, donde tendrá lugar

## Introducción

la diferenciación de las bacterias a bacteroides, que son las formas especializadas en la FBN (Fig. I.1E). La diferenciación implica cambios en el tamaño y la morfología celular, junto con una serie de cambios genéticos (endorreduplicación cromosómica) y metabólicos (Foucher & Kondorosi, 2000; Jones *et al.*, 2007).



**Figura I.1. Etapas durante la formación de la simbiosis rizobio-leguminosa.** A) Diálogo molecular entre los rizobios y la planta hospedadora, durante el que los flavonoides de la planta atraen a las bacterias y activan la expresión de los genes *nod* bacterianos encargados de la producción de los factores Nod. B) Adhesión de las bacterias a los pelos radicales. C) Curvatura del pelo radical que permite la entrada de los rizobios. D) Elongación del canal de infección. E) Ramificación de canales de infección y posterior diferenciación de las bacterias a bacteroides. Modificado de Jones *et al.*, 2007.

En el bacteroide tiene lugar la expresión de los genes necesarios para la actividad de la enzima nitrogenasa (genes *nif* y *fix*). Esta enzima es muy sensible al oxígeno, por lo que el nódulo incluye una barrera celular de difusión al oxígeno que junto con otros mecanismos moleculares, como la producción de una proteína por parte de la planta con una alta afinidad por el oxígeno (leghemoglobina), proporcionan el ambiente microoxygenado adecuado para que tenga lugar la FBN en el interior del nódulo (Bever & Simms, 2000; Timmers *et al.*, 2000). En esta interacción simbiótica, los bacteroides proporcionan a la planta una forma de nitrógeno asimilable y a cambio los rizobios reciben fotosintetizados como fuente de carbono (Gage, 2004). Por lo tanto, el correcto funcionamiento del proceso simbiótico garantiza a la planta una independencia de otras

---

fuentes de nitrógeno exógenas mientras que la bacteria encuentra un ambiente exclusivo para su multiplicación.

Los nódulos de las leguminosas se clasifican en nódulos determinados e indeterminados. Los nódulos determinados se originan a partir de la división de células del córtex externo. Estas divisiones cesan pronto y el aumento del tamaño del nódulo se produce por crecimiento de las células, lo que les confiere una forma esférica. En su interior existe una población homogénea de células vegetales repletas de simbiosomas con bacteroides fijadores. En contraste, los nódulos indeterminados, se originan a partir de divisiones del córtex interno y presentan un meristemo apical persistente, que continuamente está generando nuevas células que serán alcanzadas por los canales de infección e infectadas por los rizobios. La presencia de este meristemo apical les confiere a los nódulos indeterminados una forma oblonga o cilíndrica característica (Gage, 2004) y en su interior se pueden diferenciar diversas zonas histológicas, desde el extremo apical hacia la base cercana a la raíz, que responden a las distintas etapas (I-IV) de organogénesis (Vasse *et al.*, 1990): zona apical meristemática, zona de infección, zona de pre-fijación, zona de fijación que contiene los bacteroides maduros. Algunos autores incluso distinguen una zona V, de degradación de bacteroides en donde bacterias no diferenciadas ejercerían saprofitismo a partir de los restos celulares (Timmers *et al.*, 2000).

El estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa es de gran importancia no solo por sus aplicaciones biotecnológicas sino también por ser un paradigma en las interacciones planta-microbio y en general de las interacciones eucariota-microorganismo. Diversos mecanismos moleculares empleados por los rizobios para la invasión y colonización de su leguminosa hospedadora son también utilizados por bacterias patógenas (Soto *et al.*, 2009). Es por ello que la comprensión del funcionamiento de la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas puede permitir a su vez el entendimiento de otro tipo de relaciones entre eucariotas (tanto animales como vegetales) con bacterias, particularmente patógenas, facilitando la búsqueda de soluciones biotecnológicas que permitan combatirlas de forma eficaz.

### **1.1. Aspectos relevantes de la interacción *Rhizobium etli* -*Phaseolus vulgaris***

La bacteria *Rhizobium etli* CFN42 (Ret) es objeto principal de estudio en esta tesis doctoral, por lo que vamos a profundizar en el conocimiento de este rizobio y su interacción con la planta hospedadora.

*R. etli* (Ret) es una  $\alpha$ -Proteobacteria, perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*. Es un microorganismo Gram-negativo aerobio de forma bacilar durante su etapa de vida libre, que establece interacciones simbióticas con la leguminosa *Phaseolus vulgaris* (judía común). En países de Latinoamérica, esta simbiosis toma especial relevancia, ya que la judía o frijol constituye uno de los principales aportes de proteínas y carbohidratos en la dieta diaria de la población.

En esta tesis doctoral se ha trabajado concretamente con la cepa Ret CFN42, cuyo genoma se encuentra secuenciado y disponible para la comunidad científica (González *et al.*, 2003; González *et al.*, 2006). Su genoma consta de un total de 6.5 Mb repartidos en 7 replicones, el cromosoma de 4.3 Mb y 6 plásmidos de diferentes tamaños conocidos como pRetCFN42a, b, c, d, e y f. El plásmido p42d contiene la mayoría de los genes *nod*, *nif* y *fix*, por lo que se le considera el plásmido simbiótico o pSym.

Ret es capaz de sintetizar diferentes polisacáridos estructurales como el lipopolisacárido (LPS) previamente descrito (Carlson *et al.*, 1995; Forsberg & Carlson, 1998; Gil-Serrano *et al.*, 1992) o el polisacárido capsular (CPS). Además, en el genoma de Ret encontramos diversos operones relacionados con la biosíntesis de otros EPS previamente caracterizados en otros rizobios:

**1.  $\beta$ -(1-2)-glucano cíclico**, cuya síntesis depende de los genes *ndvA* y *ndvB* (RHE\_CH03997 y RHE\_CH04000 respectivamente). Este polisacárido es común en rizobiales, se encuentra mayoritariamente en el periplasma y desempeña funciones de osmoprotección, además de intervenir en el establecimiento de una correcta interacción rizobio-leguminosa. En general los  $\beta$ -glucanos cíclicos son necesarios para las interacciones bacteria-hospedador, tanto simbiosis como patógenos de animales y vegetales (Breedveld & Miller, 1994; Ielpi *et al.*, 1990).

**2. Exopolisacárido ácido (EPS)**, formado por residuos de glucosa, galactosa, ácido glucurónico, ácido pirúvico y ácido acético en una proporción 5:1:2:2:1 (Gil-Serrano *et al.*, 1992). También ha sido previamente identificado en *R. leguminosarum* (Janczarek & Skorupska, 2001; Krol *et al.*, 1998). La producción de este EPS está

---

determinada por los genes *pss*, que en *Ret* se encuentran organizados en dos grupos: i) uno que contiene los genes *pssVUT<sub>1</sub>SRMLKJIHGF<sub>1</sub>CDE* y *pssPONT<sub>2</sub>* (RHE\_CH03210 al RHE\_CH03236), entre los cuales encontramos otros genes implicados en el sistema de secreción de este EPS y ii) el segundo clúster con los genes *pssBA<sub>2</sub>* (RHE\_CH03327 y RHE\_CH03328). En *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841, este EPS ácido está implicado en la formación de biopelículas, tanto en superficies bióticas como abióticas, así como en el desarrollo de los nódulos (Williams *et al.*, 2008).

3. En *Ret* encontramos un grupo de 14 genes (RHE\_CH03380-RHE\_CH03393) con cuatro glicosiltransferasas, dos proteínas de transporte de polisacáridos, una acetiltransferasa, una endoglicanasa y una proteína reguladora, donde los genes RHE\_CH03385 y RHE\_CH03388 presentan una homología superior al 50% con los genes *exoY* y *exoF* de *Sinorhizobium meliloti* encargados de la síntesis de succinoglicano o EPSI, el cual es esencial para el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa (Becker *et al.*, 2002; Glenn *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1999). Desconocemos si estos genes están implicados en la biosíntesis de algún polisacárido de *R. etli*.

4. **Glucomanano o polisacárido unipolar (UPP)**, previamente caracterizado en *R. leguminosarum* y en *A. tumefaciens* (Williams *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013). Su biosíntesis depende de una agrupación de seis genes (en CFN42, RHE\_CH01558 a RHE\_CH01563) que se encuentran muy conservados en bacterias rizobiales que interaccionan con plantas (Williams *et al.*, 2008). En *R. leguminosarum* este EPS es necesario para la adhesión a raíces de veza y para una infección competitiva. En el patógeno de plantas *A. tumefaciens*, el UPP es requerido para la adhesión polar de esta bacteria al entrar en contacto con una superficie abiótica o biótica (Matthyse, 2014; Xu *et al.*, 2013). Su producción se encuentra activada por el segundo mensajero c-di-GMP, aunque por algún mecanismo todavía no descrito (Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016).

5. **Celulosa**, es un polímero no ramificado formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-4), presente en numerosas bacterias. En el caso de *Ret*, la síntesis de celulosa posiblemente corre a cargo del operón *celABCD*, donde *CelA* y *CelB* serían las subunidades catalíticas que forman el complejo celulosa sintasa. *CelC*, es una endoglucanasa (celulasa) que intervendría en el empaquetamiento de las fibras de

celulosa y CelG estaría en contacto con el peptidoglicano, organizando el complejo multiproteico que facilita la extrusión del biopolímero al exterior de la célula (Römling & Galperin, 2015). En *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens*, la celulosa interviene en la adhesión a sus respectivas plantas hospedadoras, aunque no parece importante para la nodulación o la virulencia, respectivamente (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005; Matthyse, 1983; Smit *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 2008). El c-di-GMP es un regulador alostérico positivo de la celulosa sintasa (Barnhart *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2014; Ross *et al.*, 1987).

**6.  $\beta$ -Glucano de enlaces mixtos (MLG).** Los genes RHE\_PE00362 y RHE\_PE00363 de Ret son homólogos a los genes *bgsBA* de *S. meliloti* 8530, necesarios para la síntesis del recientemente descubierto  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Este EPS es necesario para una adhesión eficiente de *S. meliloti* 8530 a las raíces de su hospedador, *Medicago sativa* (alfalfa). La producción de este nuevo EPS también se encuentra regulada por c-di-GMP en *S. meliloti* 8530 (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015).

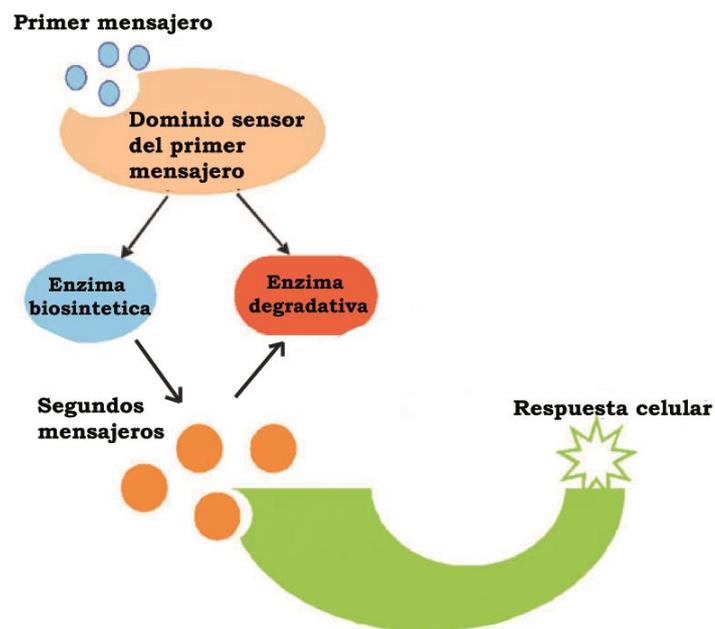
La regulación específica de los polisacáridos UPP, celulosa y MLG por c-di-GMP, será discutida más adelante en esta tesis doctoral (Apartado 3.2 de esta Introducción).

## **II. EL C-DI-GMP COMO SEGUNDO MENSAJERO**

Cualquier organismo vivo está continuamente recibiendo señales del medio exterior, señales que son integradas a través de complejas cascadas de transducción de señales, permitiendo a los organismos responder y/o adaptarse a los cambios del medio que los rodea.

En las células procariotas, los diferentes estímulos extracelulares e intracelulares, también conocidos como primeros mensajeros, son percibidos por proteínas que poseen determinados dominios sensores (Fig. I.2). En ciertos casos y como respuesta a dichos estímulos, se altera la concentración intracelular de pequeñas moléculas conocidas como segundos mensajeros, que se unirán directamente sobre moléculas efectoras para desencadenar una respuesta fisiológica acorde al estímulo primario (Fig. I.2) (Kalia *et al.*, 2013).

Los sistemas de transducción de señales basados en segundos mensajeros presentan varias ventajas: i) Los segundos mensajeros son pequeñas moléculas intracelulares de bajo peso molecular, por lo que pueden difundir rápidamente por el interior celular, ii) su concentración depende de actividades enzimáticas de síntesis y degradación, lo que permite respuestas inmediatas y iii) permiten la amplificación de la señal original, pudiendo generar respuestas celulares contundentes a partir de pequeños estímulos (Yan & Chen, 2010).



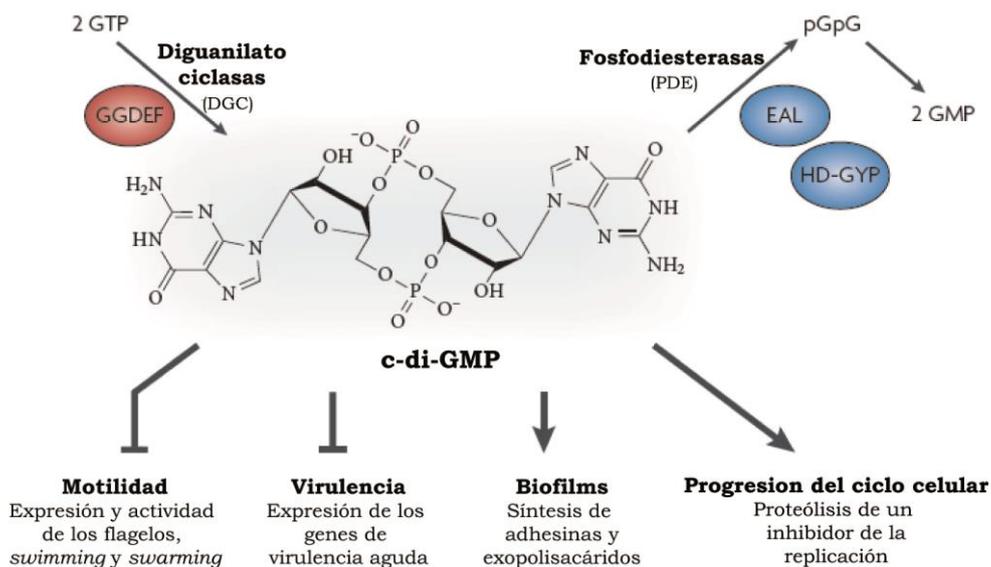
**Figura I.2. Mecanismo genérico de acción de los segundos mensajeros.** En respuesta a un primer mensajero, las enzimas encargadas de la síntesis o degradación de los segundos mensajeros aumentan o reducen rápidamente los niveles intracelulares de estos, permitiendo una respuesta celular rápida que implica su unión a moléculas efectoras. Modificado de Yan y Chen, 2010.

Entre los segundos mensajeros bacterianos más estudiados, se encuentran nucleótidos cíclicos como el bis-(3'-5')-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP), el bis-(3'-5')-adenosina monofosfato cíclico (c-di-AMP), el 3'-5'-guanosina monofosfato cíclico (cGMP) o el 3'-5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Kalia *et al.*, 2013). En los últimos años, el c-di-GMP ha emergido como un segundo mensajero en bacterias, clave para la regulación de diferentes procesos celulares relacionados con la transición entre un estilo de vida mótil y un estilo de vida sésil o sedentario (D'Argenio & Miller, 2004; Römling *et al.*, 2005; Schirmer & Jenal, 2009). Recientemente, este segundo mensajero, que se pensaba que era exclusivo del dominio Bacteria, también se

## Introducción

ha encontrado en el eucariota *Dictyostelium discoideum*, en donde controla procesos de diferenciación celular (Chen & Schaap, 2012).

Hace 28 años que el c-di-GMP fue descubierto como un activador alostérico de la celulosa sintasa en *Gluconacetobacter xylinus* por Moshe Benziman y colaboradores (Ross *et al.*, 1987) y desde entonces, el número de funciones celulares reguladas por este segundo mensajero ha ido en aumento. En los últimos años, gracias a técnicas bioinformáticas, genéticas y bioquímicas, el campo del c-di-GMP avanza rápidamente permitiendo un conocimiento más amplio acerca de este segundo mensajero. El c-di-GMP estimula la producción y síntesis de adhesinas y exopolisacáridos que forman parte de la matriz de las biopelículas, mientras que inhibe distintas formas de motilidad, permitiendo a las bacterias adoptar un estilo de vida sedentario (Krasteva *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2007; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014) (Fig. I.3). Además, el c-di-GMP controla la virulencia en patógenos de animales y plantas (Jenal & Malone, 2006; Ryan *et al.*, 2007; Tamayo *et al.*, 2007), permite el avance del ciclo celular (Duerig *et al.*, 2009), la producción de antibióticos (Fineran *et al.*, 2007), o la respuesta a estreses medioambientales (Klebensberger *et al.*, 2007), entre otras funciones. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que el c-di-GMP puede actuar como un inmunomodulador en mamíferos, afectando a la respuesta del sistema inmunitario frente a patógenos bacterianos (Karaolis *et al.*, 2007; Schirmer & Jenal, 2009).



**Figura I.3. Estructura y funciones celulares controladas por c-di-GMP.** De forma general, altos niveles intracelulares de c-di-GMP regulan de forma positiva la formación de biopelículas y la progresión del ciclo celular, mientras inhiben la motilidad bacteriana, o la virulencia aguda en patógenos. Modificado de Hengge, 2009.

## **2.1 Biosíntesis y degradación del c-di-GMP**

El c-di-GMP se sintetiza a partir de dos moléculas de GTP por enzimas diguanilato ciclasas (DGC), cuya actividad suele estar asociada a proteínas con dominios GG[D/E]EF, así denominados en base a la secuencia aminoacídica de su centro activo (Fig. I.3) (Chan *et al.*, 2004; Römling *et al.*, 2005). Este dominio GGDEF suele estar muy conservado en la mayoría de las DGC activas, aunque parecen existir algunas excepciones y algunos cambios aminoacídicos en la secuencia consenso GG[D/E]EF que permiten mantener la actividad DGC (Hunter *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011a).

Por otro lado, el c-di-GMP es degradado por fosfodiesterasas específicas (PDE). La actividad PDE está asociada a proteínas que portan dominios EAL (Rao *et al.*, 2008) o HD-GYP (Ryan *et al.*, 2007), siendo las primeras más abundantes en los genomas bacterianos. Las PDE con dominios EAL degradan el c-di-GMP hasta el intermediario 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG), el cual es posteriormente degradado hasta dos moléculas de GMP por la acción de otras fosfodiesterasas. Por su parte, las proteínas HD-GYP degradan el c-di-GMP directamente hasta 2 moléculas de GMP (Hengge, 2009) (Fig. I.3).

### ***2.1.1. Diguanilato ciclasas (DGC)***

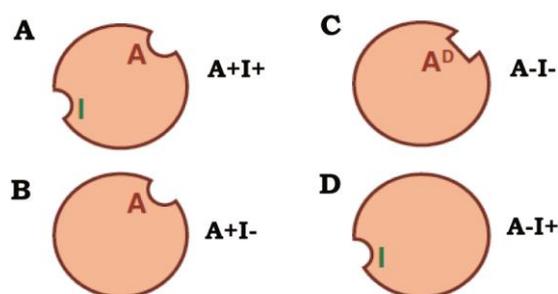
Las DGC normalmente actúan formando homodímeros, donde cada monómero porta una molécula de GTP en posición antiparalela para la formación del enlace fosfodiéster 3'-5', que culminará en la producción de c-di-GMP.

Las DGC presentan dos sitios enzimáticamente relevantes: el sitio A y el sitio I. El primero de ellos hace referencia al centro activo (dominio GGDEF), donde los dos primeros residuos de Gly estarían implicados en la unión del GTP, el tercer residuo (Asp o Glu) juega un papel fundamental en la catálisis, mientras que el cuarto residuo (Glu) participa en la coordinación de iones metálicos como el  $Mg^{2+}$  (Jenal & Malone, 2006; Whiteley & Lee, 2014). Por su parte, el sitio I, situado cinco aminoácidos aguas arriba del sitio A, es un sitio inhibitorio no competitivo de alta afinidad por el c-di-GMP. Posee una secuencia consenso conservada, RXXD (siendo X cualquier aminoácido), de manera que su unión al c-di-GMP impide la aproximación de los dos sitios A de cada monómero, imposibilitando la síntesis de c-di-GMP. Estudios

## Introducción

bioinformáticos demuestran que el 57% de las proteínas con dominios GGDEF poseen este mecanismo de inhibición no competitiva por producto (Christen *et al.*, 2006). En algunas DGC, se ha observado que la inhibición alostérica no competitiva tiene lugar mediante la unión de dos moléculas intercaladas de c-di-GMP al sitio I (Schirmer & Jenal, 2009). La regulación de la actividad DGC por producto permite modular la actividad enzimática y los niveles de c-di-GMP, evitando al mismo tiempo un excesivo consumo de GTP.

Dependiendo de que los sitios A e I se encuentren conservados (+) o degenerados (-), es posible distinguir cuatro tipos distintos de DGC:  $A^+I^+$ ,  $A^+I^-$ ,  $A^-I^+$  y  $A^-I^-$  (Fig. I.4). En el primero de los casos, nos encontramos normalmente con DGC con alta actividad enzimática, y que por tanto necesitan de la regulación alostérica por producto (Fig.I.4 A). En el segundo caso, nos encontraríamos a DGC que bien por su baja actividad o por el proceso específico que regulan, no necesitan de un mecanismo de regulación por producto (Fig.I.4 B). Las proteínas que portan un sitio  $A^-$  combinado con un sitio  $I^+$ , suelen ser proteínas enzimáticamente inactivas, que han evolucionado hacia proteínas efectoras que responden a los niveles intracelulares de c-di-GMP. Un ejemplo de este tipo de DGC lo encontramos en PelD de *Pseudomonas aeruginosa* (Whitney *et al.*, 2012) (Fig.I.4 D). Por último, es posible identificar proteínas que son  $A^-I^-$ , que aunque han perdido la actividad DGC y no unen c-di-GMP, pueden unir GTP (Fig.I.4 C). Este es el caso de PdeA de *Caulobacter crescentus*, en la que la unión del GTP al sitio A degenerado activa al dominio PDE de la misma proteína (Christen *et al.*, 2005).



**Figura I.4. Distintos tipos de proteínas con dominios GGD/EEF.** Clasificación esquemática de las cuatro posibles combinaciones (A, B, C y D) de los sitios A (catalítico) e I (inhibitorio) y sus propiedades, conservado (+) o degenerado (-). Adaptado de Jenal y Malone, 2006.

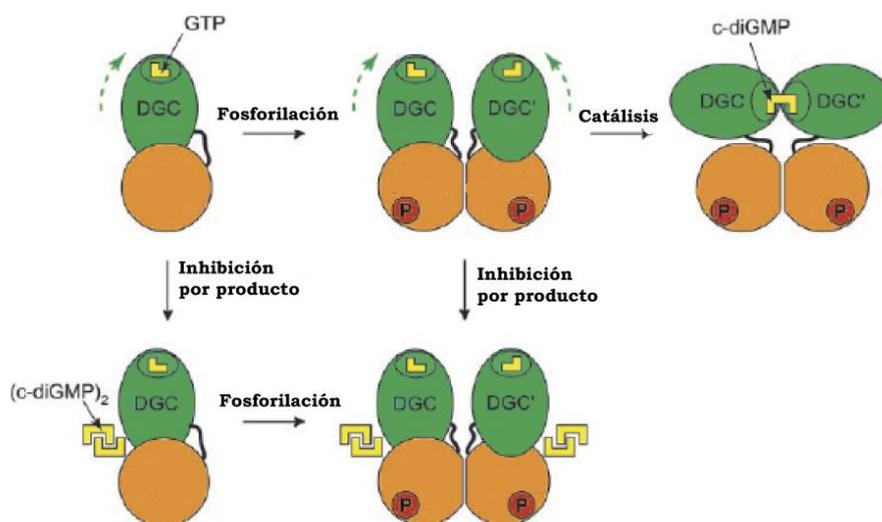
---

#### 2.1.1.1. La diguanilato ciclasa PleD

La DGC PleD es un regulador de respuesta que forma parte de un sistema de dos componentes de *C. crescentus*. Esta bacteria porta un flagelo polar y posee una división asimétrica muy particular, de forma que la división celular comienza por la eyección del flagelo y la síntesis de un pedículo o protuberancia de naturaleza polisacárida (*holdfast*), con un botón de adhesión en el extremo que la ancla al substrato (Aldridge *et al.*, 2003). Tras la división celular se forman dos tipos de células especializadas: una célula planctónica móvil conocida como célula *swarmer*, y otra célula que permanecerá anclada a la superficie, y que recibe el nombre de célula *stalked*. La proteína PleD tiene un papel crucial tanto en el proceso de división celular como en el de diferenciación morfológica. La fosforilación de PleD por la quinasa DivJ provoca su dimerización y migración al polo de la futura célula *stalked*, donde el c-di-GMP producido por PleD-P controla la eyección del flagelo y el desarrollo del pedículo que anclará la célula a la superficie (Paul *et al.*, 2004).

**Mecanismo de acción de PleD:** PleD es una DGC con sitios A e I activos. Además del dominio GGD/EEF (en este caso es GGEEF), PleD posee dos dominios receptores de grupos fosfatos conocidos como REC1 y REC2, respectivamente. Solo el primero de ellos posee un residuo aspártico en la posición 53 susceptible de fosforilación por DivJ. La forma inactiva (no fosforilada) de PleD se encuentra en estado monomérico. Tras la fosforilación del residuo Asp53 del dominio REC1, PleD sufre una serie de cambios conformacionales que culminan con la formación de dímeros enzimáticamente activos (Fig. I.5). De esta forma, los dominios catalíticos (sitios A) de los dos monómeros quedan próximos, permitiendo la condensación de dos moléculas de GTP para dar lugar al c-di-GMP. Cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados, se produce la unión de dos moléculas intercaladas de este segundo mensajero al sitio I, impidiendo la aproximación de los dominios catalíticos y por lo tanto la formación de c-di-GMP (Fig. I.5) (Chan *et al.*, 2004).

La DGC empleada en esta tesis doctoral se conoce como PleD\*, ya que posee una serie de cambios aminoacídicos que la hacen independiente de fosforilación para su activación, y por tanto presenta actividad DGC constitutiva (Paul *et al.*, 2004). Es importante resaltar que PleD\* sigue manteniendo la inhibición por producto no competitiva.



**Figura I.5. Mecanismo de acción de PleD.** Tras la fosforilación del dominio REC1 (naranja), el dominio catalítico (verde), sufre una serie de cambios conformacionales que culminan con la formación de homodímeros. Los dominios catalíticos portando dos moléculas de GTP (amarillo) quedan enfrentados, lo que permite la síntesis de c-di-GMP. La unión de dos moléculas de c-di-GMP (c-diGMP<sub>2</sub>) al sitio inhibitorio impide el acercamiento de los dominios catalíticos, produciendo la inhibición por producto no competitiva. Adaptado de Chan *et al.*, 2004.

### 2.1.2. Fosfodiesterasas (PDE)

Existen dos tipos de fosfodiesterasas capaces de hidrolizar el c-di-GMP: las EAL y las HD-GYP, ambas así conocidas en base a la conservación de secuencia aminoacídica de su centro activo. Las EAL son más abundantes en los genomas bacterianos y catalizan la hidrólisis del c-di-GMP hasta 5'-pGpG, que posteriormente será degradado por otras enzimas. Las HD-GYP, pertenecen a la superfamilia de fosfohidrolasas que directamente rompen la molécula de c-di-GMP en dos de GMP (Hengge, 2009; Ryan *et al.*, 2007).

Las PDE con dominios EAL muestran una alta especificidad por el c-di-GMP, ya que presentan una baja  $K_m$  (420 nM), lo que concuerda con los bajos niveles intracelulares de este segundo mensajero (Christen *et al.*, 2005; Reinders *et al.*, 2015). Estas proteínas necesitan de cationes divalentes como el  $Mg^{2+}$  o el  $Mn^{2+}$  para llevar a cabo la hidrólisis, una agrupación de dos cationes metálicos coordinan dos moléculas de agua, una de las cuales participa en el ataque hidrofílico a uno de los enlaces fosfoéster del c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). Por otro lado, las PDE son fuertemente inhibidas por  $Ca^{2+}$ . Las PDE con dominios EAL tienen cierta actividad enzimática como monómeros, aunque la mayoría de las PDE caracterizadas hasta el momento forman dímeros u oligómeros de mayor orden *in vitro* (Barends *et al.*, 2009). La activación de

las PDE mediante la formación de dímeros tendría lugar en respuesta a estímulos ambientales (Bai *et al.*, 2012).

Estudios llevados a cabo por Rao y colaboradores con la PDE de *P. aeruginosa* RocR, pusieron de manifiesto una secuencia consenso con siete aminoácidos esenciales para la actividad PDE, de forma que cualquier cambio en alguno de estos aminoácidos conllevaría la pérdida o descenso de la actividad catalítica (Rao *et al.*, 2008). En rojo se muestran los aminoácidos descritos como esenciales:

EAL<sub>57</sub>NX<sub>33</sub>EX<sub>2</sub>EX<sub>26</sub>DX<sub>20</sub>KX<sub>35</sub>E

Las PDE con dominios HD-GYP son menos abundantes en bacterias y por ello están menos estudiadas. Estas proteínas HD-GYP hidrolizan el c-di-GMP directamente hasta GMP. Esto podría ser debido a que no liberan el intermediario 5'-pGpG o que este se vuelve a unir a la proteína para ser completamente degradado hasta GMP (Römling *et al.*, 2013). Las PDE con dominios HD-GYP presentan dos secuencias consenso separadas por una región variable de 10-20 aminoácidos (Ryan *et al.*, 2010). Estas secuencias consenso son: HDXGK y HHEXXDGXGYPXXL (siendo X cualquier aminoácido). La cristalización de la proteína con dominio HD-GYP, Bd1817 de la bacteria depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus*, arrojó nueva información acerca de su mecanismo de acción. Además, estos estudios permitieron identificar los cationes metálicos Fe<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como parte del centro activo de la enzima (Lovering *et al.*, 2011).

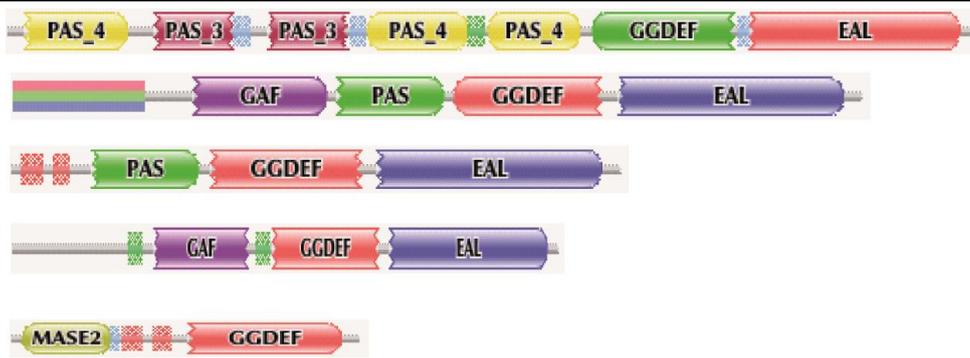
### 2.1.3. Dominios sensores en proteínas DGC y PDE

Las DGC y PDE pueden estar controladas por una gran variedad de señales ambientales e intracelulares. La mayoría de estas enzimas poseen uno o varios dominios sensores en el extremo N-terminal, permitiendo una integración precisa de la señal primaria y la transducción de esta información al interior celular, mediante la modificación de los niveles del segundo mensajero c-di-GMP (Mills *et al.*, 2011). Señales como el oxígeno (dominio PAS), la luz (dominio BLUF), fosforilación (dominio REC), antibióticos, el potencial redox, la osmolaridad, nucleótidos (dominio GAF) o moléculas de *quorum sensing* como acil-homoserina lactonas (AHL) entre otras, son reconocidas por dominios sensores presentes en DGC y PDE (Fig. I.6) (Hengge, 2009). A pesar de que la mayoría de las DGC y PDE presentan al menos un

dominio sensor, en la actualidad se conoce un escaso número de señales que realmente puedan activarlas (Mills *et al.*, 2011). Uno de los primeros dominios sensores descritos fue el dominio PAS, encontrado en varias DGC de *G. xylinus*, el cual es capaz de responder a los niveles de oxígeno del medio y modular la actividad diguanilato ciclasa del dominio GGDEF asociado (Tal *et al.*, 1998).

Existe un número muy significativo de proteínas que contienen ambos dominios GGDEF y EAL, con actividades contrapuestas (Seshasayee *et al.*, 2010). Si cada dominio por separado es capaz de llevar a cabo su función ¿Por qué están presentes ambas actividades DGC y PDE en la misma proteína? Una posible explicación es que ambos dominios GGDEF y EAL sean activos en la misma proteína, pero que sus actividades se encuentren reguladas diferencialmente por señales ambientales y/o intracelulares (Römling *et al.*, 2013). Una regulación diferencial de dominios con actividades opuestas se ha observado previamente en proteínas con actividad histidina quinasa y fosfatasa, o en la proteína SpoT que cataliza la síntesis y degradación de la alarmona ppGpp (Perego & Hoch, 1996; Potrykus & Cashel, 2008). Todavía hay pocos ejemplos de proteínas con dominios GGDEF y EAL cuya bifuncionalidad haya sido empíricamente demostrada. Uno de ellos es la proteína ScrC de *Vibrio parahaemolyticus*, que posee actividad DGC que cambia a PDE en presencia de las proteínas ScrA y ScrB (Ferreira *et al.*, 2008). Otra posible explicación a la existencia de dominios DGC y PDE en tándem, es que uno o ambos dominios DGC y PDE no sea enzimáticamente activo y haya adquirido otras funciones reguladoras o sensoras. Entre estas posibles funciones encontramos la unión de GTP a dominios GGDEF inactivos (Christen *et al.*, 2005) o la unión de c-di-GMP a dominios EAL degenerados (Qi *et al.*, 2011).

La presencia en una misma molécula de dominios sensores y dominios GGDEF y EAL/HD-GYP, con actividades antagónicas, podría permitir respuestas más precisas y rápidas a través de la señalización por c-di-GMP (Mills *et al.*, 2011).



**Figura I.6. Algunos dominios sensores presentes en proteínas con dominios GGDEF y/o EAL.** La mayoría de las proteínas con actividad DGC y PDE contienen también dominios sensores. Estos dominios sensores responderían a distintas señales externas y/o internas, como la luz, niveles de oxígeno, nutrientes o nucleótidos cíclicos, las cuales constituyen los primeros mensajeros.

## 2.2. Moléculas efectoras

La capacidad del c-di-GMP para regular distintas funciones celulares, radica en la diversidad de moléculas receptoras que son capaces de responder a los niveles de este segundo mensajero (Ryan *et al.*, 2012b; Wolfe & Visick, 2010). Entre estos efectores se encuentran proteínas con dominios PilZ, factores de transcripción, DGC y PDE con dominios GGDEF y EAL degenerados e incluso secuencias de ARNm, conocidos como *riboswitches*. Estos efectores son los encargados de traducir los niveles de c-di-GMP en una respuesta celular específica, a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traduccional.

### *2.2.1. Proteínas con dominios PilZ*

Estudios bioinformáticos identificaron este dominio como un posible receptor del c-di-GMP presente en la subunidad A de la celulosa sintasa (BcsA) de *G. xylinus* y la proteína YcgR que controla la motilidad en Enterobacterias (Amikam & Galperin, 2006; Ryjenkov *et al.*, 2006). Este dominio recibió este nombre por tener la misma estructura terciaria que la proteína PilZ de *P. aeruginosa*, que controla la formación de pili tipo IV (Alm *et al.*, 1996). Paradójicamente, la proteína PilZ no es capaz de unir c-di-GMP.

Los dominios PilZ están formados por 6 láminas  $\beta$  en posición antiparalela, formando una estructura típica en Barril  $\beta$ . Alineamientos de la secuencia aminoacídica de varios dominios PilZ, muestran una baja conservación de la estructura primaria, excepto en varios residuos aminoacídicos altamente conservados (Benach *et al.*, 2007).

## Introducción

---

En primer lugar, encontramos la secuencia (Q/E)RRXXXR, donde las argininas (R) son esenciales para la unión del c-di-GMP. Separada por unos 20 a 30 aminoácidos encontramos otra secuencia, (D/N)ZSXXG, (donde Z es cualquier aminoácido hidrofóbico) que también juega un papel importante en la unión al c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2012b). A pesar de la baja homología en la secuencia primaria en los dominios PilZ, todos ellos muestran una estructura terciaria similar (Fig. I.7 A).

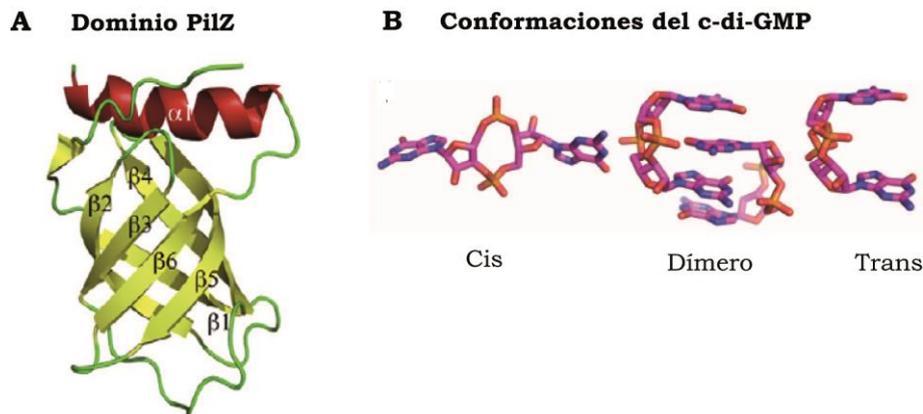
El dominio PilZ se encuentra distribuido en proteínas codificadas en numerosos genomas bacterianos, aunque no existe una correlación directa entre el número de proteínas PilZ y el de proteínas que metabolizan el c-di-GMP (con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP). Por ejemplo, *E. coli* solo posee dos proteínas con dominios PilZ y un total de 29 proteínas con dominios DGC y PDE, mientras que *B. bacteriovorus* contiene 15 proteínas con dominios PilZ y 12 proteínas hipotéticamente implicadas en el metabolismo del c-di-GMP.

Una revisión reciente de diferentes dominios PilZ, ha permitido clasificar estos dominios en tres tipos: i) tipo I, corresponderían con dominios PilZ completos que presentan ambas secuencias (Q/E)RRXXXR y (D/N)ZSXXG, capaces de unir directamente el c-di-GMP con gran afinidad, ii) tipo II, carecen de la secuencia (Q/E)RRXXXR y no pueden unir c-di-GMP y iii) tipo III, formados por una versión truncada del dominio PilZ que también han perdido la capacidad de unir c-di-GMP (Chou & Galperin, 2016).

Estudios estructurales mediante rayos X o RMN indican que la unión del c-di-GMP al motivo (Q/E)RRXXXR, provoca cambios conformacionales en la proteína, afectando alostéricamente la actividad enzimática o facilitando interacciones proteína-proteína. Este es el caso de Alg44 (PA4608) de *P. aeruginosa*, en la que la unión del c-di-GMP a su dominio PilZ desencadena la formación de una superficie altamente negativa en uno de los lados de la proteína, facilitando su unión con otras proteínas implicadas en la síntesis de alginato (Habazettl *et al.*, 2011). En el caso de la proteína YcgR, presente en numerosas especies de Enterobacterias, a pesar de que el dominio PilZ tiene la misma organización estructural, la respuesta celular es muy distinta. La unión del c-di-GMP al dominio PilZ de YcgR regula la velocidad y dirección de giro del flagelo, a través de la interacción de YcgR con el complejo FliGMN (Boehm *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2010). Además de la motilidad o la producción de exopolisacáridos

como la celulosa o el alginato, la unión del c-di-GMP a dominios PilZ regula otras funciones celulares. En *Klebsiella pneumoniae*, la proteína MrkH es capaz de unir c-di-GMP activando la transcripción de genes para la síntesis de fimbrias tipo III (Wilksch *et al.*, 2011).

Al igual que ocurría con el sitio I de las DGC, el c-di-GMP también puede unirse a los dominios PilZ con diferente estequiometría y conformación. Una sola molécula de c-di-GMP se puede unir en conformación *cis* (la forma extendida) o en conformación *trans*, en la que las bases nitrogenadas quedan enfrentadas (Fig. I.7B). Sin embargo, también es posible que la unión del c-di-GMP a las proteínas efectoras sea a través de dímeros intercalados (Chou & Galperin, 2016; Ko *et al.*, 2010; Ramelot *et al.*, 2007; Ryjenkov *et al.*, 2006). Además las proteínas con dominios PilZ pueden adoptar diferentes estados de oligomerización, desde monómeros hasta tetrámeros (Li *et al.*, 2011).



**Figura I.7. Señalización por c-di-GMP a través de dominios PilZ.** A) Representación de la estructura terciaria de un típico dominio PilZ, formado por 6 láminas  $\beta$  antiparalelas en forma de barril  $\beta$ . B) Diferentes conformaciones en las que el c-di-GMP puede unirse a proteínas efectoras. Conformación *cis* o extendida, en *trans* donde las bases nitrogenadas quedan enfrentadas, o en forma de dímeros intercalados.

Cerca de la mitad de los dominios PilZ reconocibles en genomas bacterianos se encuentran en proteínas como dominio único, mientras que el resto se asocian a otros dominios como glicosiltransferasas (GT), aceptores de grupos fosfato (REC) o dominios HTH de unión a ADN, entre otros. Además, diferentes dominios PilZ pueden responder a las concentraciones de c-di-GMP con distinta afinidad. Estudios de afinidad de los dominios PilZ de BcsA y YcgR de distintas especies mostraron una mayor afinidad de YcgR por el c-di-GMP que BcsA (Pultz *et al.*, 2012). De esta forma, la proteína efectora

YcgR responderá primero ante un pequeño cambio en la concentración celular de c-di-GMP.

### **2.2.2. Dominios DGC y PDE degenerados**

El elevado número de funciones celulares controladas por el segundo mensajero c-di-GMP, contrasta con las escasas proteínas efectoras con dominios PilZ, por lo que parece evidente que deben de existir otro tipo de efectores capaces de unir c-di-GMP. De hecho, un mutante de *Vibrio cholerae* carente de todas las proteínas con dominios PilZ, sigue respondiendo a niveles de c-di-GMP (Beyhan *et al.*, 2008). Uno de los primeros candidatos alternativos fueron las DGC y PDE con dominios degenerados. Como se ha comentado con anterioridad, algunas DGC con sitios A (GGDEF) degenerados, poseen sitios I intactos que siguen manteniendo la capacidad de unir c-di-GMP, pudiendo actuar como efectores. Un ejemplo de este tipo de efectores es la proteína PopA de *C. crescentus*, una DGC con un dominio GGDEF degenerado pero con un sitio I activo. PopA es la encargada de secuestrar al regulador maestro del ciclo celular, CtrA, para su degradación por la proteasa ClpXP. La correcta localización de PopA en los polos de la célula en división depende de la unión del c-di-GMP a su sitio I (Duerig *et al.*, 2009).

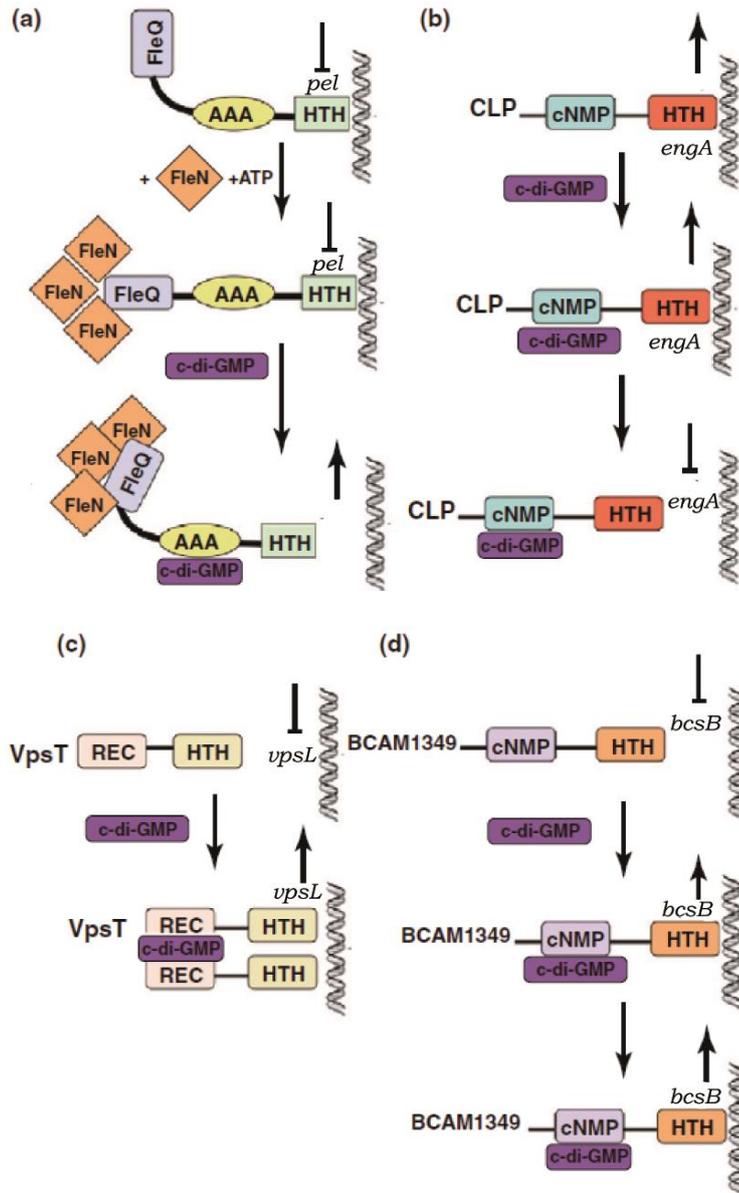
De manera análoga, ciertas PDE que han perdido su actividad catalítica son todavía capaces de unir c-di-GMP. Este es el caso de FimX de *P. aeruginosa*, en la que la unión del c-di-GMP al dominio EAL inactivo provoca cambios conformacionales en la proteína que determinan su localización en el interior de la bacteria (Qi *et al.*, 2011). LapD de *Pseudomonas fluorescens*, es un ejemplo de proteína efectora con ambos dominios GGDEF y EAL degenerados. En este caso, la unión del c-di-GMP al dominio EAL de LapD controla la formación de biopelículas a través de la adhesina LapA y la proteasa LapG (Newell *et al.*, 2009).

### **2.2.3. Factores de transcripción**

Se han descrito varios factores de transcripción capaces de unir c-di-GMP en diferentes especies bacterianas. La mayoría de ellos controlan inversamente la inhibición de la motilidad y el aumento en la producción de EPS.

En *P. aeruginosa*, el factor de transcripción FleQ fue uno de los primeros reguladores transcripcionales identificados cuya actividad es dependiente de c-di-GMP. FleQ contiene un dominio HTH de unión al ADN, un dominio central ATPasa (AAA+) que interacciona con factores sigma 54 y un dominio REC N-terminal que no responde a fosforilación. FleQ es un regulador maestro que activa la expresión de los genes flagelares *fleSR* y de otros genes responsables del ensamble del aparato de exportación flagelar (Hickman & Harwood, 2008). En bajos niveles de c-di-GMP, FleQ junto con FleN tienen un efecto negativo en la producción del polisacárido Pel, a través de su unión a dos regiones conocidas como caja 1 y caja 2, situadas aguas abajo y aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *pel*. En esta situación, se produce una curvatura en el ADN que reprime a los genes *pel*. Sin embargo, la unión del c-di-GMP a una región próxima al dominio Walker (AAA+), provoca cambios conformacionales que hacen que la curvatura del ADN desaparezca pero FleQ permanezca unido a la caja 1, convirtiéndose ahora en un activador del EPS Pel (Fig. I.8 A). De esta forma, FleQ actúa como activador de los genes del flagelo y como represor de los genes *pel* (Baraquet *et al.*, 2012; Baraquet & Harwood, 2013). Mediante calorimetría isoterma de titulación, se ha podido comprobar que FleQ une c-di-GMP con una afinidad de 4  $\mu$ M, lo que está en concordancia con los niveles fisiológicos de c-di-GMP, estimados en los rangos micromolar y submicromolar (Gentner *et al.*, 2012; Matsuyama *et al.*, 2016; Simm *et al.*, 2004).

Otro regulador transcripcional que no presenta un dominio PilZ es la proteína Clp de varias especies del género *Xanthomonas*. Esta proteína muestra una gran similitud con la proteína receptora de AMPc Crp de *E. coli* (Chin *et al.*, 2010). En este caso, Clp no controla la utilización de las fuentes de carbono, sino la expresión de genes de virulencia y de enzimas extracelulares, como la endoglucanasa EngA, mediante su unión a las regiones promotoras de estos genes. Cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP aumentan, su unión a Clp reduce la afinidad de esta por el ADN, causando un descenso de la expresión de los genes regulados (Fig. I.8 B).



**Figura I.8. Modelos esquemáticos del mecanismo de actuación del c-di-GMP en diferentes factores transcripcionales.** A) Activación de la producción del exopolisacárido Pel de *P. aeruginosa* mediante la unión del c-di-GMP a FleQ. B) Represión de los genes de la endoglucanasa EngA de *Xanthomonas campestris* a través de Clp. C) Activación del polisacárido Vps de *V. cholerae* por la unión del c-di-GMP al factor de transcripción VpsT. D) Activación mediada por Bcam1349 de los genes de la celulosa sintasa en *B. cenocepacia*. Adaptado de Ryan *et al.*, 2012.

En *V. cholerae* el factor de transcripción VpsT controla la producción de componentes de la matriz extracelular, la motilidad y la formación de biopelículas. VpsT consiste en un dominio REC (aunque no regulado por fosforilación) y en un dominio HTH. La unión del c-di-GMP provoca una oligomerización de esta proteína, lo que permite que active la expresión de los genes *vps* responsables de la formación del polisacárido Vps característico de *Vibrio* (Fig. I.8 C) (Krasteva *et al.*, 2010; Shikuma *et*

*al.*, 2012). En el regulador transcripcional Bcam1349 de *Burkholderia cenocepacia*, también encontramos una regulación positiva por c-di-GMP. Bcam1349 regula la producción de celulosa y de fimbrias implicadas en la formación de biopelículas en esta bacteria. Bcam1349 se une a las regiones promotoras del operón de la celulosa sintasa, de forma que su unión a c-di-GMP incrementa su afinidad por el promotor de *bcsB*, aumentando la expresión de todo el operón *bcs* (Fazli *et al.*, 2011) (Fig. I.8 D).

*Streptomyces venezuelae* es una bacteria con un comportamiento multicelular, con una etapa de crecimiento vegetativo y otra etapa reproductiva, de formación de hifas aéreas. El factor de transcripción BldD es un regulador maestro que inhibe la expresión de los genes de esporulación durante el desarrollo vegetativo (den Hengst *et al.*, 2010). Recientemente, se ha descrito que cuatro moléculas de c-di-GMP son las responsables de causar la dimerización de BldD promoviendo su unión al ADN. El c-di-GMP reconoce la secuencia RXR-X<sub>8</sub>-RXXD presente en cada monómero de BldD (Tschowri *et al.*, 2014). De esta forma el c-di-GMP actúa como una molécula promotora de la dimerización de BldD, para el control de los genes de esporulación y por tanto, la transición hacia la etapa reproductiva en *Streptomyces*.

#### **2.2.4. Riboswitches**

Los *riboswitches* se encuentran ampliamente distribuidos en el dominio Bacteria y pueden actuar como activadores o como inhibidores de la transcripción y/o traducción. Se trata de receptores de pequeñas moléculas que forman parte de la región 5' no codificante (UTR) de los ARNm. Estas secuencias de ARN que se conocen como aptámeros, pueden unir diferentes metabolitos y regular la expresión de genes a nivel transcripcional o a nivel traducional (Shanahan & Strobel, 2012; Sudarsan *et al.*, 2008).

Entre los efectores del c-di-GMP encontramos dos tipos de *riboswitches*. Aproximadamente 500 candidatos de *riboswitches* tipo I, se han sido identificado en varias especies (Sudarsan *et al.*, 2008). Los de tipo II tienen una distribución más reducida, encontrándose fundamentalmente en *Clostridium* y *Chloroflexi* (Lee *et al.*, 2010). Estos *riboswitches* son capaces de unir el segundo mensajero c-di-GMP con una afinidad de hasta 10 pM *in vitro*. Esta afinidad es mayor a la descrita hasta el momento para cualquier dominio PilZ, sin embargo todavía no está clara la afinidad de los *riboswitches* por el c-di-GMP *in vivo* (Hengge, 2010). Entre los genes regulados por

*riboswitches* los hay implicados en la formación de biopelículas, motilidad, pili y en la síntesis y degradación del propio c-di-GMP (Sudarsan *et al.*, 2008)

El c-di-GMP no solo controla el procesamiento del ARN mediante su unión a *riboswitches*, sino que además es capaz de regularlo a través de su unión directa con la enzima polinucleótido fosforilasa (PNPasa), la cual forma parte del degradosoma del ARN de *E.coli*. La enzima PNPasa forma un complejo con la DGC DosC y la PDE DosP, las cuales se encuentran activadas por bajos y altos niveles de oxígeno, respectivamente. De esta forma el procesamiento del ARN mediado por c-di-GMP está afectado por la concentración de oxígeno ambiental (Tuckerman *et al.*, 2011).

### **2.2.5. Otros efectores del c-di-GMP**

Gracias a las nuevas estrategias de búsqueda de efectores basadas en el empleo de análogos del c-di-GMP para la captura de posibles proteínas efectoras (Düvel *et al.*, 2012; Nesper *et al.*, 2012), o en el empleo de la técnica DRaCALA (del inglés *Differential Radial Capillary Action of Ligand Assay*) (Roelofs *et al.*, 2011), recientemente se han descrito varias hipotéticas proteínas efectoras del c-di-GMP. En el capítulo 3 de esta tesis doctoral se describirán con más detalle los métodos para la identificación de nuevas proteínas efectoras.

Mediante el uso de la técnica DrACALA, se ha identificado un nuevo dominio conocido como GIL (GGDEF I site like domain) en la proteína BcsE de *E. coli*, *Salmonella entérica* y *Klebsiella pneumoniae*. Este presenta una secuencia consenso RXGD que recuerda al sitio I (RXXD) de las DGC. En *Salmonella*, BcsE no es necesaria para la síntesis de celulosa pero si es esencial para la máxima producción de este exopolisacárido (Fang *et al.*, 2014).

Empleando un método de captura basado en un compuesto trifuncional desarrollado en el laboratorio de Urs Jenal, se han identificado varios efectores (Laventie *et al.*, 2015; Nesper *et al.*, 2012). Diferentes ATPasas de los sistemas de transporte del flagelo (FliI) y de los sistemas de secreción tipo III (HrcN) y IV (ClpB2) en diversas especies bacterianas, han sido confirmadas como proteínas efectoras del c-di-GMP (Trampari *et al.*, 2015). Estos datos han supuesto la implicación del c-di-GMP en distintas maquinarias celulares para la exportación de sustancias al exterior. Esta misma metodología fue empleada en la bacteria depredadora *B. bacteriovorus* para la

identificación de tres proteínas que actúan como efectoras en esta bacteria (Rotem *et al.*, 2016). De estas tres proteínas, dos de ellas (Bd2717 y Bd2402) contienen dominios PilZ mostrando una alta afinidad por el c-di-GMP ( $K_D$  de 0.17 y 0.39  $\mu\text{M}$  respectivamente). La otra proteína identificada es una acil-CoA-dehidrogenasa (Bd2924), que posee una menor afinidad por el c-di-GMP ( $K_D = 7.67 \mu\text{M}$ ).

La cantidad de efectores diferentes sobre los que puede actuar el c-di-GMP, indica la gran diversidad y complejidad de las rutas de señalización relacionadas con este segundo mensajero. A pesar de los avances de los últimos años, es necesario continuar trabajando en este campo para la comprensión de los mecanismos moleculares y de los procesos biológicos controlados por el c-di-GMP.

### **III. FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR C-DI-GMP**

Tras el descubrimiento del c-di-GMP hace 28 años, este segundo mensajero apareció como una molécula clave en bacterias durante la transición de un estilo de vida planctónico a un estilo de vida sedentario, tras la adhesión y formación de biopelículas sobre superficies bióticas o abióticas. Hoy en día sabemos que el c-di-GMP, además, está implicado en la supervivencia de patógenos obligados de insectos y mamíferos (Römling *et al.*, 2013), en el control del desarrollo y la producción de antibióticos en estreptomicetes (Tschowri *et al.*, 2014), la formación de heterocistos en cianobacterias (Neunuebel & Golden, 2008) o en la resistencia a estreses en micobacterias (Bharati *et al.*, 2012). En este apartado nos centraremos principalmente en aquellos fenotipos bacterianos relacionadas con la transición hacia un estilo de vida sedentario.

#### **3.1. Motilidad bacteriana**

El c-di-GMP es capaz de inhibir distintos tipos de motilidad bacteriana: tipo *swimming*, *swarming*, *twitching* y *gliding* (Krasteva *et al.*, 2010; Kuchma *et al.*, 2007; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Römling *et al.*, 2013). Sin embargo, lo más sorprendente son las diversas formas en las que este segundo mensajero puede actuar sobre la motilidad bacteriana, actuando a nivel transcripcional, postranscripcional y postraduccional (Wolfe & Visick, 2008).

Existen varios factores de transcripción capaces de regular la motilidad bacteriana de una forma dependiente de c-di-GMP. Además, muchos de ellos están implicados en

## Introducción

---

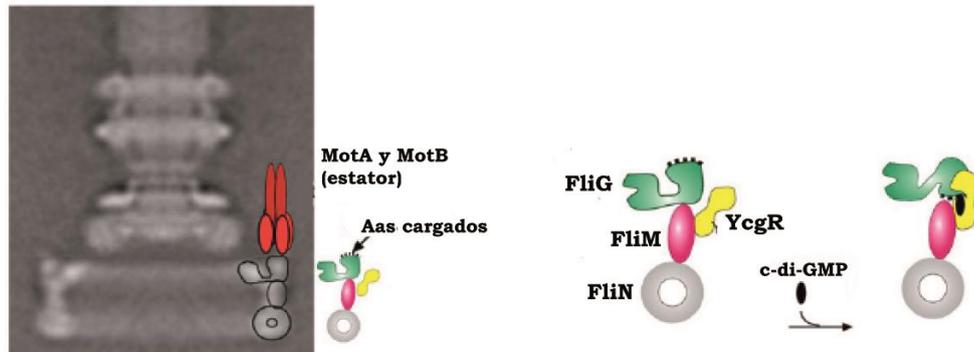
la regulación inversa de los genes flagelares y la producción de exopolisacáridos. Así, las bacterias controlan de una forma precisa la transición hacia un estilo de vida sedentario.

En *P. aeruginosa*, el factor de transcripción FleQ regula los genes flagelares de una manera dependiente de la concentración de c-di-GMP. Cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados, la unión del c-di-GMP a FleQ inhibe su actividad ATPasa impidiendo la transcripción de los genes flagelares (Baraquet & Harwood, 2013). Por otro lado, estudios transcriptómicos con mutantes *vpsT* de *V. cholerae* muestran un aumento de la expresión de genes del flagelo, indicando una represión por parte de VpsT (Krasteva *et al.*, 2010). No obstante, hay que destacar que el efecto inhibitorio de estos factores de transcripción (FleQ y VspT) sobre los genes flagelares es muy leve, modulando sus niveles de expresión más que inhibiéndolos completamente.

En *P. putida* la proteína híbrida MorA, que presenta dominios GGDEF y EAL en tándem, también regula la transcripción de genes flagelares al actuar como DGC y aumentar los niveles de c-di-GMP en esta bacteria. Mutantes en *morA* presentan una mayor motilidad tipo *swimming*, además de tener mayores cantidades de transcritos del gen *fliC* (Wolfe & Visick, 2008)(Choy *et al.*, 2004).

La baja represión de los genes flagelares observada en presencia de elevadas concentraciones de c-di-GMP, no concuerda con la nula motilidad observada en las bacterias que forman parte de una biopelícula, por lo que deben de existir otros mecanismos moleculares que controlen la motilidad a través de los niveles de c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). En *E. coli* el c-di-GMP también puede regular la motilidad a nivel posttraducional, a través de su unión con la proteína flagelar YcgR. YcgR posee un dominio PilZ en el extremo N-terminal capaz de unir c-di-GMP con elevada afinidad (Ryjenkov *et al.*, 2006). Cuando los niveles intracelulares de este segundo mensajero comienzan a elevarse por la acción de DGC y/o inhibición de PDE, la unión del c-di-GMP al dominio PilZ provoca cambios conformacionales que culminan con la interacción entre YcgR y la proteína del rotor FliG a través de una serie de aminoácidos cargados (Paul *et al.*, 2010). Esta interacción YcgR/FliG a su vez impide que FliG pueda interactuar con la proteína MotA, frenándose el flujo de protones a través de la membrana necesario para la rotación del rotor (FliG, FliM y FliN) (Fig. I.9). De esta

forma YcgR actúa como un auténtico freno molecular al disminuir la rotación del flagelo cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados (Boehm *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2010).



**Figura I.9. Modelo esquemático del control de la motilidad por YcgR y c-di-GMP.** La unión del c-di-GMP al dominio PilZ de YcgR desencadena cambios conformacionales que favorecen su interacción con FliG. Esta interacción YcgR/FliG impide que la superficie cargada de FliG se una a la proteína MotA, inhibiendo el movimiento de rotación del flagelo. Aminoácidos (Aas). Adaptado de Paul *et al.*, 2010.

En el caso de *Salmonella entérica*, la motilidad está regulada, además de por YcgR, por la producción de celulosa cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados. La mayor cantidad de celulosa producida en respuesta a un aumento de los niveles de c-di-GMP, rodea las células actuando como un impedimento físico para la rotación del flagelo (Zorraquino *et al.*, 2013). Este trabajo pone de manifiesto la importancia de la celulosa en *Salmonella* durante la transición hacia un estilo de vida sedentario, donde además de formar parte de las biopelículas contribuye a inhibir completamente la motilidad.

Hasta el momento solo hemos descrito inhibición de los tipos de motilidad que dependen de flagelos, como son *swimming* y *swarming* (Kearns, 2010). Sin embargo, la motilidad tipo *twitching* depende de la retracción y extensión de pili tipo IV, cuya síntesis también se encuentra regulada por c-di-GMP. En *P. aeruginosa* la biogénesis de los pili tipo IV y la motilidad *twitching* requieren de FimX, una proteína que une c-di-GMP a través de su dominio EAL degenerado (Jain *et al.*, 2012). En el patógeno de plantas *Xanthomonas*, la retracción y extensión de los pili tipo IV también depende del c-di-GMP, donde un complejo proteico compuesto por RpfG (HD-GYP), dos DGC y una proteína con un dominio PilZ, interaccionan con las ATPasas encargadas de la retracción de dichos pili (Ryan *et al.*, 2012a). Estos datos sugieren que la retracción y

extensión de los pili tipo IV podría estar controlada por rápidas fluctuaciones en los niveles locales de c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013).

La motilidad tipo *gliding* depende de complejos focales de adhesión. El control de este tipo de motilidad por c-di-GMP es menos conocido. Sin embargo, en *B. bacteriovorus* la motilidad tipo *gliding* es utilizada sobre superficies durante la fase de ataque, para la búsqueda de nuevas presas. La mutación de DgcA (Bd0367), una de las tres DGC que posee esta bacteria, impide la motilidad tipo *gliding* en esta bacteria depredadora (Hobley *et al.*, 2012).

### **3.2. Exopolisacáridos regulados por c-di-GMP**

La producción de exopolisacáridos (EPSs) bacterianos es un proceso fisiológico controlado por diferentes situaciones. Entre los papeles que desempeñan los EPSs están el mantenimiento de la integridad de las envueltas celulares, la protección frente a la desecación y otros estreses, así como la formación de biopelículas (Whitney & Howell, 2012).

Hasta el momento, se conocen cuatro mecanismos diferentes para la síntesis y secreción de EPS bacterianos: I) la ruta dependiente del sistema Wzx/Wzy, donde las subunidades oligosacáridicas, producidas por una o varias glicosiltransferasas citoplasmáticas y unidas a un residuo de undecaprenil fosfato, son translocadas al espacio periplásmico por una flipasa (Wzx). Es aquí donde ocurre la polimerización a cargo de la proteína Wzy antes de ser exportados al exterior. II) Dependientes de transportadores tipo ABC, sistema usualmente empleado para la producción de CPS. III) Dependientes de sintasa, glicosiltransferasas que acoplan la síntesis con la secreción del polímero a través de la membrana, como la celulosa sintasa. IV) Síntesis extracelular, lo que implica la secreción al medio de sintasas que quedan covalentemente unidas a la membrana bacteriana (Schmid *et al.*, 2015).

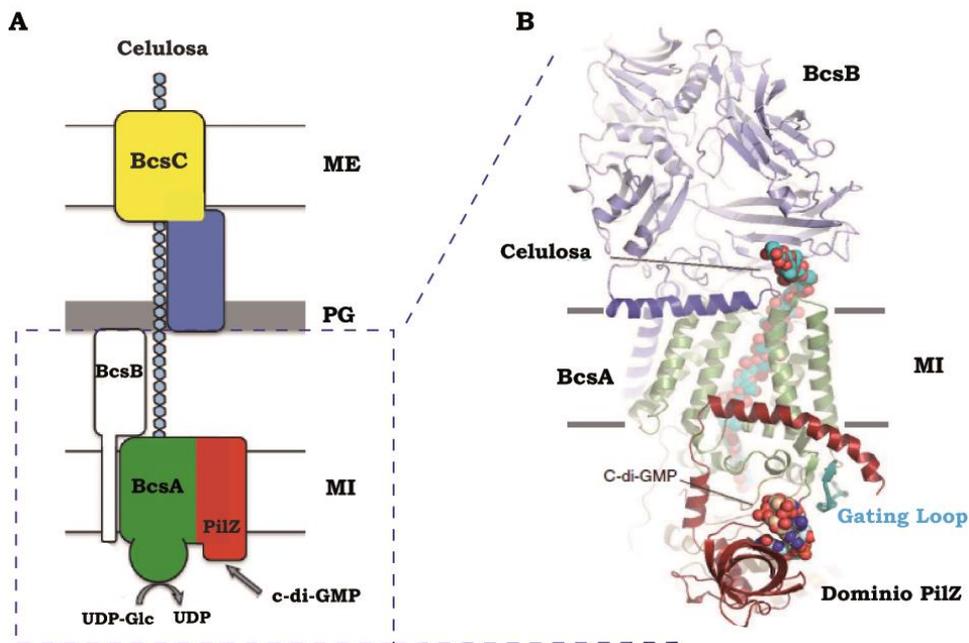
En la actualidad se tienen datos de que el c-di-GMP regula la producción de EPSs que utilizan bien sistemas Wzx/Wzy o bien sistemas sintasa-dependientes (Liang, 2015; Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016). En esta sección nos centraremos en aquellos EPS producidos por distintas bacterias que se encuentran regulados por el segundo mensajero c-di-GMP, tanto a nivel transcripcional como a nivel posttraduccional.

### 3.2.1. Celulosa

La celulosa es un polímero constituido por residuos de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4), que ha sido documentado en una gran variedad de especies bacterianas. Una de las primeras bacterias donde se describió la síntesis de celulosa fue en *Gluconacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1991), pero después se ha documentado en patógenos de plantas como *A. tumefaciens* o *Erwinia chrysanthemi* (Matthyse, 1983; Römling, 2002), patógenos de peces (Bassis & Visick, 2010), bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (Napoli *et al.*, 1975), y en enterobacterias como *E. coli* o *Salmonella* (Solano *et al.*, 2002; Zogaj *et al.*, 2001). Además, la celulosa es uno de los componentes habituales de muchas biopelículas bacterianas.

La síntesis de celulosa corre a cargo de la celulosa sintasa, un complejo proteico formado por las subunidades catalíticas BcsA (CelA) y BcsB (CelB) (Omadjela *et al.*, 2013). BcsA es una proteína de membrana interna formada por 8 hélices transmembrana, un dominio glicosiltransferasa (GT) citosólico y un dominio PilZ C-terminal (Fig. I.10A). BcsB es una proteína periplásmica anclada a la membrana interna por un dominio transmembrana. BcsC, otra proteína del complejo proteico, es necesaria para exportar la cadena polisacáridica desde el periplasma hacia el exterior. En determinadas especies, existen proteínas accesorias que son necesarias para la máxima producción de celulosa (Römling & Galperin, 2015).

Atendiendo a la presencia o ausencia de genes que codifican para estas proteínas accesorias, se pueden establecer tres clases de operones de celulosa: i) tipo I, se encuentran en  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -Proteobacterias y se caracterizan por la presencia de *bcsD*, cuya función es dirigir la cadena de celulosa hacia la membrana externa; ii) tipo II, presente en  $\beta$ - y  $\gamma$ -Proteobacterias y se caracterizan por la presencia de *bcsG* y *bcsE*. La proteína BcsE también puede unir c-di-GMP a través de su dominio GIL, dando un nivel de regulación adicional a la producción de celulosa en estas bacterias; iii) tipo III, lo encontramos en *Agrobacterium* y *Rhizobium*, incluye los genes *bcsZ*, *bcsK* pero no *bcsD*, *bcsE* ni *bcsG* (Römling & Galperin, 2015).



**Figura I.10. Complejo celulosa sintasa.** A) Representación esquemática del complejo celulosa sintasa. La cadena creciente del polisacárido (hexágonos azules), atraviesa la capa de peptidoglucano (PG) gracias a proteínas accesoria (en azul) y sale al exterior a través de la proteína de membrana externa (ME) BcsC. B) Estructura terciaria de BcsA y BcsB de la bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Se representa el mecanismo de activación de la celulosa por c-di-GMP al desplazar el denominado *gating loop* (en azul) de BcsA. MI, membrana interna. Adaptado de Whitney y Howell, 2012 y de Morgan *et al.* 2014.

Las celulosa sintasas utilizan UDP-glucosa como sustrato. Esta molécula es transferida al grupo hidroxilo 4' no reductor de la cadena polisacárida creciente, liberándose UDP (Fujiwara *et al.*, 2013). Las fibras de celulosa van siendo translocadas a través de un canal de membrana formado por BcsA, acoplándose de esta manera la síntesis y la exportación del polímero (Morgan *et al.*, 2013). En ausencia del segundo mensajero c-di-GMP, BcsA, se encuentra en un estado “autoinhibido” en el que el acceso del sustrato UDP-glucosa al centro activo está bloqueado por el denominado *gating loop* (Fig. I.10B). La unión del c-di-GMP al dominio PilZ de BcsA provoca cambios conformacionales en la proteína, que culminan con el alejamiento del C-terminal del sitio activo, lo que permite el libre acceso del sustrato al sitio activo y la actividad enzimática (Morgan *et al.*, 2014).

Además de la regulación alostérica por c-di-GMP de la celulosa sintasa, existen mecanismos de regulación adicionales en diferentes bacterias. En *G. xylinus*, la producción de celulosa depende de la concentración de oxígeno, activándose en condiciones aeróbicas. A través de su dominio PAS, la PDE A1 percibe los niveles de oxígeno. Cuando estos son bajos se estimula la actividad PDE, manteniendo bajos los

---

niveles intracelulares de c-di-GMP e impidiendo la producción de celulosa (Chang *et al.*, 2001).

En otras bacterias la regulación de la celulosa depende de la activación de determinadas DGC que aporten la cantidad necesaria de c-di-GMP para la celulosa sintasa. Por ejemplo en *E. coli* y *S. typhimurium*, la biosíntesis de celulosa está regulada principalmente por las DGC YedQ y AdrA (Zogaj *et al.*, 2001), mientras que en *A. tumefaciens* la DGC CelR, homóloga a PleD de *Caulobacter*, parece ser la principal encargada de suministrar el c-di-GMP a la celulosa sintasa (Barnhart *et al.*, 2013).

En algunos miembros de *Pseudomonas* la producción de celulosa se encuentra regulada a nivel transcripcional por el factor de transcripción AmrZ, el cual se une a la región promotora del operón de la celulosa impidiendo la transcripción de los genes *wss*, además de regular la expresión de otras dianas como las DGC MorA y AdcA (Prada-Ramírez *et al.*, 2015). Además, en *P. fluorescens* la expresión constitutiva de la DGC WspR regula la transcripción del operón de la celulosa (Goymer *et al.*, 2006). También se da una regulación transcripcional de la producción de celulosa en *B. cenocepacia*, a través de la unión del c-di-GMP al factor de transcripción Bcam1349 (Fazli *et al.*, 2011) (Fig. I.8).

### 3.2.2. Alginatos

Son polímeros lineales de alto peso molecular, constituidos por residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y su epímero  $\alpha$ -L-gulurónico en distintas proporciones, y unidos por enlaces  $\beta$ -(1-4) (Evans & Linker, 1973). Los alginatos son comunes en las paredes celulares de algas pardas-marrones (*Phaeophyceae*), pero también ciertas bacterias producen alginato. Por ejemplo, es el principal exopolisacárido producido por cepas mucosas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística crónica, protegiéndolas frente al sistema inmunitario y a la fagocitosis por los macrófagos (Mann & Wozniak, 2012). En bacterias la producción de este polisacárido está principalmente regulada por c-di-GMP a nivel posttraduccional. En *Pseudomonas*, Alg44 (PA3542) es una proteína de membrana interna que forma parte del complejo proteico encargado de la biosíntesis de alginato. Alg44 posee un dominio PilZ en el extremo N-terminal capaz de unir c-di-GMP con gran afinidad (Merighi *et al.*, 2007). El mecanismo por el cual la unión del c-di-GMP activa la producción de alginato es aún

desconocido, aunque todo indica que la interacción del c-di-GMP con el dominio PilZ desencadena cambios conformacionales en la proteína, que facilitan la interacción con otras proteínas de la maquinaria de síntesis y translocación del alginato (Römling *et al.*, 2013).

La producción de este polisacárido también se encuentra regulada a nivel transcripcional a través del factor de transcripción AmrZ mencionado anteriormente. En este caso, al contrario que en la celulosa, AmrZ actuaría como un activador al unirse al operón del alginato (Jones *et al.*, 2013).

### **3.2.3. Psl y Pel**

El Psl está formado por subunidades pentasacáridicas repetidas, compuestas de L-ramnosa, D-manosa y D-glucosa (Ma *et al.*, 2007), mientras que el Pel es un polisacárido rico en glucosa cuya estructura química aun es desconocida (Vasseur *et al.*, 2005). Los exopolisacáridos Psl y Pel son los principales componentes de la matriz extracelular de las cepas no mucosas de *P. aeruginosa*. Mientras que la capacidad de producir Pel se encuentra muy extendida dentro de todas las cepas de esta especie, la producción de Psl está más limitada.

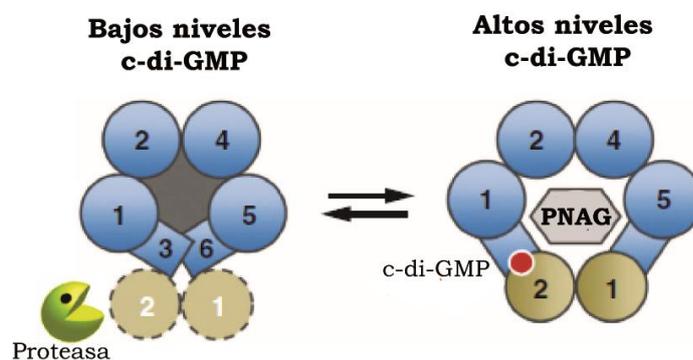
Ambos polisacáridos son activados a nivel transcripcional por c-di-GMP. El factor de transcripción FleQ actúa como un activador de la transcripción de los genes *pel* y *psl* tras su unión con el c-di-GMP. La regulación del polisacárido Pel por c-di-GMP a nivel transcripcional se ha descrito detalladamente en el apartado 2.2.3.

La biosíntesis del EPS Pel se encuentra además regulada por c-di-GMP a nivel postraducional. La proteína PelD, que forma parte del complejo proteico de síntesis de Pel, es una DGC de membrana con un dominio GGDEF citoplasmático degenerado, pero que conserva un sitio I (RXXD) capaz de unir c-di-GMP con una afinidad entre 1 y 2  $\mu$ M. La unión del c-di-GMP a PelD es necesaria para la correcta producción del EPS Pel (Lee *et al.*, 2007; Whitney *et al.*, 2012). No obstante, el mecanismo por el cual el c-di-GMP activa la producción de este EPS es aún desconocido.

### **3.2.4. Poli- $\beta$ -1,6-N-acetil-glucosamina (PNAG)**

El PNAG es otro exopolisacárido producido por una gran variedad de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; Whitney &

Howell, 2012). En *E. coli* la producción de PNAG depende del complejo proteico PgaABCD (Itoh *et al.*, 2008). Las proteínas PgaA y PgaB se encargan del transporte al exterior de las cadenas crecientes de PNAG, mientras que PgaC y PgaD forman las subunidades catalíticas necesarias para la síntesis de este polisacárido. PgaC presenta un dominio glicosiltransferasa encargado de añadir las unidades de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) a la cadena de PNAG creciente. PgaD es una proteína de membrana interna cuya función se desconoce, pero es esencial para la síntesis de este EPS (Wang *et al.*, 2004).



**Figura I.11. Representación esquemática de la activación del complejo PgaCD por c-di-GMP en *E. coli*.** Cuando la concentración de c-di-GMP es baja, PgaD (en gris) es rápidamente degradada por proteasas, impidiendo la formación de poli-N-acetilglucosamina (PNAG). Cuando los niveles de c-di-GMP se elevan, este segundo mensajero se une a ambas proteínas PgaD y PgaC (en azul) estabilizando el complejo. Modificado de Steiner *et al.*, 2012.

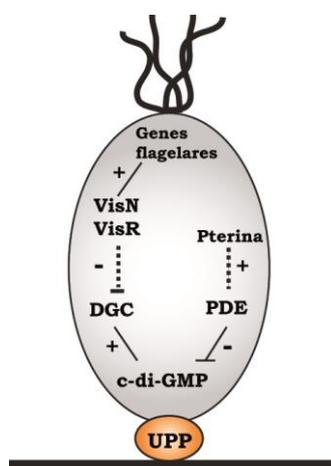
Estudios llevados a cabo en el laboratorio de Urs Jenal (Basel, Suiza), pusieron de manifiesto que el c-di-GMP interacciona directamente con las dos subunidades PgaC y PgaD, estabilizando la interacción de ambas proteínas e incrementando la actividad glicosiltransferasa (Fig. I.11). En condiciones de bajas concentraciones de c-di-GMP, por la inhibición de las DGC YdeH y DosC, PgaD no interacciona con PgaC y es rápidamente degradado por proteasas, impidiendo la síntesis de PNAG (Steiner *et al.*, 2012). Este fue el primer trabajo que demostró que el c-di-GMP puede facilitar las interacciones proteína-proteína.

### 3.2.5. Exopolisacárido unipolar (UPP)

El patógeno de plantas *A. tumefaciens* es capaz de producir un glucomanano o polisacárido unipolar (UPP), además de celulosa, en respuesta a altos niveles de c-di-GMP (Xu *et al.*, 2013). Este UPP es producido rápidamente en uno de los polos de la

célula tras establecer contacto con superficies tanto abióticas como bióticas. Es imprescindible para la formación de biopelículas y agregados en forma de rosetas por *A. tumefaciens*, ya que mutantes en el gen *uppE* son incapaces de formar estas estructuras (Xu *et al.*, 2012). La sobreexpresión de la DGC homóloga a PleD de *C. crescentus*, CelR, provoca un incremento en la producción de UPP independiente del contacto con una superficie. Este UPP, además, está indirectamente regulado a nivel transcripcional por los factores de transcripción VisN y VisR, implicados en el control de la motilidad en *S. meliloti* (Fig. I.12) (Sourjik *et al.*, 2000). La proteína VisR ejerce una regulación negativa sobre la producción de UPP a través de la inhibición de tres DGC, indicando que el c-di-GMP es necesario para la producción del polisacárido, aunque el mecanismo por el cual el c-di-GMP ejerce su acción es aún desconocido (Xu *et al.*, 2013).

Recientemente se ha descubierto que el compuesto heterocíclico Pterina, es capaz de regular la concentración de c-di-GMP en *A. tumefaciens*, a través de un mecanismo que modula la doble actividad DGC y PDE de DcpA (Fig. I.12) (Feirer *et al.*, 2015). La formación del UPP en *A. tumefaciens* no solo depende de elevados niveles de c-di-GMP, sino que existen otras señales reguladores, como las concentraciones de fosfato y de calcio en el medio (Matthysse, 2014; Xu *et al.*, 2012).



**Figura I.12. Modelo de la regulación del polisacárido unipolar (UPP) a través de c-di-GMP en *A. tumefaciens*.** Los altos niveles de c-di-GMP promovidos por la activación de DGC y/o inhibición de PDE, activan la producción de UPP. Varias DGC son reprimidas a nivel transcripcional indirectamente (línea discontinua) por los reguladores VisNR, los cuales controlan la expresión de los genes flagelares. Así mismo, la actividad PDE esta indirectamente modulada por el compuesto pterina.

Los genes encargados de la biosíntesis del UPP, *uppABCDEF* (Atu1235-1240), se encuentran muy conservados en otras bacterias de la familia *Rhizobiaceae* y en algunos

miembros de  $\alpha$ -Proteobacterias como *C. crescentus*. El gen *uppE* es homólogo al bien caracterizado *hfsE* de *C. crescentus*, implicado en la biosíntesis del pedículo que anclará la célula a una superficie (Toh *et al.*, 2008). En *R. leguminosarum*, este polisacárido polar había sido previamente descrito como un polisacárido neutro de alto peso molecular rico en glucosa y manosa, por lo que se denominó glucomanano (Laus *et al.*, 2006). En la interacción *R. leguminosarum*-veza, el glucomanano es necesario para la adhesión de la bacteria a las raíces en condiciones de pH ligeramente ácido (Laus *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008).

### 3.2.6. $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG)

La producción del recientemente descubierto  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) en *S. meliloti* 8530, también se encuentra regulada alostéricamente por c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Este polisacárido está formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-3) y  $\beta$  (1-4) alternantes. Su biosíntesis corre a cargo de los genes *bgsBA* (Smb20390-20391), localizados en el plásmido simbiótico pSymB.

El producto del gen *bgsB* contiene un dominio de la familia de transportadores HlyD implicados en la exportación de una gran variedad de compuestos (Pimenta *et al.*, 2005). Además, BgsB presenta homología con proteínas de fusión de membrana (MFP), las cuales forman poros o canales a través de las membranas interna y externa de la bacteria para la excreción de diversos compuestos, siendo por tanto probable su papel en la excreción del MLG al exterior celular. BgsA es una proteína de membrana compuesta por 7 hipotéticos dominios transmembrana, una región citoplasmática con un dominio glicosiltransferasa (GT) muy conservado y un dominio C-terminal capaz de unir c-di-GMP, que no corresponde a un dominio PilZ (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). El MLG se puso de manifiesto mediante la sobreexpresión de la DGC heteróloga PleD\*, por lo que podríamos pensar que la unión del c-di-GMP al dominio C-terminal de BgsA provocaría cambios conformacionales en la proteína activando la biosíntesis de este polisacárido, de una forma análoga a la activación de la celulosa.

### 3.2.7. *Curdlan*

Este EPS producido por la bacteria *A. tumefaciens* tiene una gran importancia económica, ya que se utiliza como agente gelificante en la industria alimentaria y como

componente en tratamientos antitumorales y anti-VIH (McIntosh *et al.*, 2005). El curdlan está formado por cadenas lineales de residuos glucosídicos unidos por enlaces  $\beta$ -(1-3) y su biosíntesis corre a cargo de los genes *crdASCR* (Zhang & Edgar, 2014). La estructura secundaria y terciaria de la curdlan sintasa CrdS presenta gran similitud con la MLG sintasa y la celulosa sintasa.

La producción de curdlan se ve estimulada por un descenso en el contenido de nitrógeno del medio, por lo que su biosíntesis se ve afectada por el sistema de dos componentes NtrC/NtrB. Además de la concentración de nitrógeno, la producción de curdlan se encuentra regulada por c-di-GMP a nivel transcripcional. Estudios transcriptómicos realizados durante la producción de curdlan en *A. tumefaciens*, pusieron de manifiesto que tres DGC se encontraban sobreexpresadas en estas condiciones (Ruffing & Chen, 2012). La construcción de mutantes delecionados en estas tres DGC, corroboraron los datos mostrados en los *microarrays*. La delección del gen AGRO\_3967 redujo hasta en un 57% la producción de curdlan en comparación con la cepa silvestre, indicando la importancia del c-di-GMP producido por esta DGC en la síntesis de curdlan.

### 3.2.8. Xantano

EL xantano es un polímero producido por *Xanthomonas campestris* a través del sistema Wzx/WxY. Está compuesto por la repetición de un pentasacárido que constituye un esqueleto de celulosa al que se une de forma alternante, mediante enlaces  $\alpha$ -(1-3), un trisacárido compuesto por dos unidades de manosa y una de ácido glucurónico (Becker, 2015; Jansson *et al.*, 1975).

La producción de xantano corre a cargo de los genes *gum*. Debido a la importancia económica e industrial del xantano, toda la ruta biosintética es muy bien conocida (Becker *et al.*, 1998; Becker, 2015). Su producción depende del factor de transcripción Clp, una proteína efectora capaz de unir c-di-GMP y que controla la virulencia en *Xanthomonas* (He *et al.*, 2007). La regulación por c-di-GMP del xantano es hasta el momento el único ejemplo de una regulación negativa de un EPS por diguanilato cíclico. La unión del c-di-GMP a Clp provoca la disociación de este del ADN, impidiendo la transcripción de los genes *gum* (Chin *et al.*, 2010).

### **3.2.9. VPS**

El EPS de *Vibrio cholerae* o VPS es un heteropolisacárido lineal formado por unidades de glucosa, galactosa y ácido 2-acetamido-2-deoxi-gulurónico (Lim *et al.*, 2006). El VPS es necesario para la formación de biopelículas por esta bacteria. Su regulación está a cargo de los factores de transcripción VpsR y VpsT, dos proteínas efectoras que responden a los niveles intracelulares de c-di-GMP. La unión del c-di-GMP a VpsT provoca su dimerización, uniéndose a la región promotora de los genes *vps* y activando su expresión (Krasteva *et al.*, 2010; Shikuma *et al.*, 2012; Zamorano-Sánchez *et al.*, 2015).

### **3.2.9. EPS de *Listeria***

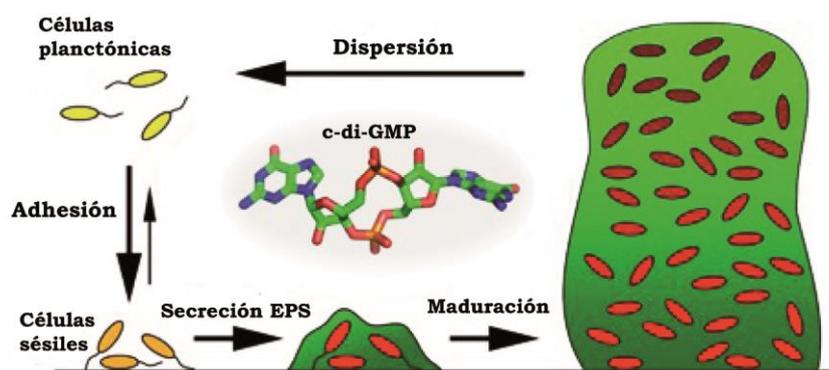
La bacteria *Listeria monocytogenes* produce un EPS formado por una cadena de N-acetil-manosamina unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4) y decorado con residuos de galactosa (Koseoglu *et al.*, 2015). Este EPS protege a las bacterias de la desecación y de agentes desinfectantes, por lo que tiene especial importancia en la persistencia de esta bacteria en los alimentos contaminados y en el medio ambiente. Su síntesis depende del operón *pssABCDE*, donde *pssC* codifica para una glicosiltransferasa de tipo II (Chen *et al.*, 2014). El último gen del operón, *pssE*, codifica para una proteína con un dominio GGDEF degenerado pero con capacidad para unir c-di-GMP en el sitio I. De esta forma, la unión del c-di-GMP a PssE activa la producción del EPS de *Listeria* (Koseoglu *et al.*, 2015).

## **3.3. Formación de biopelículas**

En la naturaleza, las bacterias se encuentran generalmente viviendo en forma de comunidades o biopelículas adheridas a superficies, tanto bióticas como abióticas. La matriz de estas biopelículas está formada por diversas sustancias poliméricas, como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Gloag *et al.*, 2013; O'Toole *et al.*, 1999). Además de inmovilizar a las bacterias, los componentes extracelulares de las biopelículas proporcionan una mayor retención de los líquidos, así como de nutrientes y otras moléculas. Además, las biopelículas proporcionan protección frente a estreses mecánicos y frente a compuestos tóxicos, de hecho las bacterias que forman parte de biopelículas muestran una tolerancia mayor al tratamiento con antibióticos y suelen

estar asociadas a enfermedades crónicas e infecciones nosocomiales (Romling & Balsalobre, 2012).

La transición de una vida móvil a una vida en biopelícula presenta varias etapas: en primer lugar las células necesitan alcanzar una superficie estableciendo un contacto reversible con la misma. Posteriormente, las bacterias comienzan a dividirse dando lugar a la formación de microcolonias (Mann & Wozniak, 2012). En una etapa posterior, las bacterias comienzan a secretar compuestos que forman parte de la matriz extracelular, quedando las células irreversiblemente adheridas (Martinez-Gil *et al.*, 2014). La biopelícula madura presenta una estructura tridimensional muy organizada, con canales para la difusión del oxígeno y de nutrientes. Algunas células de la biopelícula son liberadas de la matriz extracelular para su dispersión y la colonización de nuevos hábitats, comenzando de nuevo el ciclo (Fig. I.13).



**Figura I.13. Etapas durante la formación de biopelículas bacterianas.** Las bacterias planctónicas, en respuesta a un aumento de los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP, comienzan a disminuir la motilidad y adherirse a una superficie. Estas bacterias adheridas comienzan a secretar exopolisacáridos y otras macromoléculas que forman parte de la matriz extracelular, para dar lugar a una biopelícula madura, de la que algunas células serán liberadas posteriormente, comenzando de nuevo el ciclo. Adaptado de Krasteva *et al.*, 2012.

Todos los componentes extracelulares conocidos que contribuyen a la formación de biopelículas están regulados por c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). Como se ha descrito en la sección anterior, la producción de diferentes exopolisacáridos bacterianos se encuentra regulada, tanto a nivel transcripcional como a nivel posttraduccional, por este segundo mensajero. Para el establecimiento de biopelículas también son importantes ciertas proteínas secretadas a través de sistemas de secreción tipo I conocidas como adhesinas. Las adhesinas son proteínas de gran tamaño con una estructura repetida y que intervienen en la unión irreversible de las bacterias a una

superficie (Martinez-Gil *et al.*, 2014; Yousef & Espinosa-Urgel, 2007). En *P. fluorescens* y *P. putida* la secreción de la adhesina LapA se encuentra regulada por los niveles intracelulares de c-di-GMP. De igual forma, en el fitopatógeno *Pectobacterium atrosepticum*, la secreción al exterior de la adhesina MRP depende del balance de los niveles intracelulares de c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011a). Las fimbrias y pili tipo IV, son elementos también importantes para la formación de biopelículas, sobre todo en bacterias patógenas como *P. aeruginosa* o *K. pneumoniae* (Alm *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2015; Wilksch *et al.*, 2011). La producción de estas estructuras se encuentra regulada a nivel transcripcional por c-di-GMP, a través de la inducción de los genes que codifican su maquinaria biosintética.

Otro mecanismo importante para el establecimiento de biopelículas y que se encuentra bajo el control del segundo mensajero c-di-GMP, es la inhibición de los diferentes tipos de motilidad bacteriana (Hengge, 2009; Kuchma *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2010). Como se ha descrito en secciones anteriores, el c-di-GMP puede regular la motilidad a nivel transcripcional, a través de factores de transcripción como FleQ, o a nivel posttraducional (Baraquet & Harwood, 2013; Paul *et al.*, 2010; Ryjenkov *et al.*, 2006).

#### **IV. SEÑALIZACIÓN POR C-DI-GMP EN BACTERIAS QUE INTERACCIONAN CON PLANTAS**

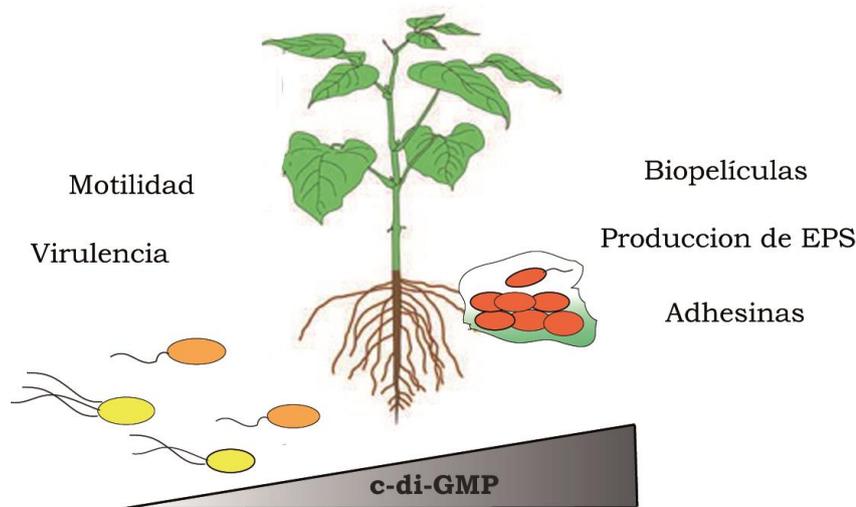
El continuo intercambio de señales que tiene lugar entre las plantas y las bacterias durante el establecimiento de una interacción patogénica o simbiótica, debe de ser interiorizado por las bacterias para adaptar y modificar su comportamiento, así como coordinar en el tiempo y en el espacio la expresión de determinantes esenciales para la colonización o invasión de la planta (Mole *et al.*, 2007). En estas etapas iniciales de la interacción con la planta, funciones bacterianas como la motilidad, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelículas en distintas superficies de las plantas o la secreción de adhesinas y factores de virulencia, son claves para el éxito de una relación planta-bacteria. El segundo mensajero c-di-GMP es, a priori, una molécula clave a la hora de orquestar todos estos procesos bacterianos, interiorizando las señales ambientales percibidas, a través de redes y cascadas regulatorias que culminan con una o varias respuestas concretas. Por lo tanto, es lógico pensar que este segundo mensajero

pueda tener un papel relevante en la regulación de la transición entre estos dos estilos de vida: saprofítica *versus* asociada a una planta hospedadora.

Las plantas exudan compuestos que constituyen una fuente de nutrientes para los microorganismos que interaccionan con ellas. La mayor fuente de estos nutrientes los encontramos en la rizosfera, donde se calcula que el 10-30% del carbono fijado por las plantas, es liberado en forma de exudados por las raíces (Danhorn & Fuqua, 2007). Cuando las bacterias del suelo se encuentran con una planta susceptible de colonización, deben de modificar su comportamiento para pasar de un estilo de vida libre saprofítico a otro en íntimo contacto con la planta. El c-di-GMP es un segundo mensajero implicado en la transición hacia un estilo de vida sedentario en numerosas bacterias (Aldridge *et al.*, 2003; Barraud *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2004; Römling *et al.*, 2013; Simm *et al.*, 2004).

De esta forma y generalizando, podemos hipotetizar un modelo en el que las bacterias que interaccionan con las plantas se encontrarían viviendo de forma saprofítica en el suelo, explorando nuevos nichos ecológicos. Ante una señal ambiental adecuada, como la generada por la presencia de una planta, los sistemas de transducción bacterianos permitirían que los niveles de c-di-GMP se incrementaran por la activación de una o varias DGC y/o inhibición de PDEs. El incremento en los niveles intracelulares de este segundo mensajero regularía de forma precisa, por una parte el “apagado” de las funciones requeridas para el estilo de vida que deja atrás, activando aquellas que son necesarias para la colonización del nuevo hábitat que se le presenta. La regulación adecuada de esta transición permitiría en última instancia a las bacterias establecerse de forma sedentaria sobre la superficie de la planta y poder llevar a cabo una interacción satisfactoria, simbiótica o patogénica, con la planta hospedadora (Fig. I.14).

Conocer las cascadas de señalización en las que está implicado el c-di-GMP, así como sus dianas, es decisivo para profundizar en el conocimiento de las relaciones mutualistas y patogénicas que las bacterias establecen con las plantas. Esto permitirá desarrollar estrategias biotecnológicas para la mejora de aquellas plantas con interés agronómico que establezcan alguna relación con bacterias.



**Figura I.14. Modelo de la fluctuación de los niveles intracelulares de c-di-GMP en las bacterias que interactúan con plantas.** De forma general, los niveles de c-di-GMP bajos (parte izquierda de la imagen) fomentan los procesos bacterianos involucrados en la vida saprobica individual, mientras que cuando los niveles intracelulares de c-di-GMP son elevados, las bacterias se encontraría predominantemente en forma de biopelículas en íntima asociación con la planta hospedadora.

La mayor o menor presencia de genes involucrados en señalización por c-di-GMP, es dependiente del estilo de vida bacteriano. De forma general, las bacterias que se enfrentan a ambientes muy complejos y cambiantes poseen un número elevado de genes que codifican para proteínas implicadas en síntesis, degradación o interacción con el c-di-GMP, y mayor que en bacterias que se desarrollan en ambientes estables (Galperin *et al.*, 2010). Así por ejemplo, el genoma del patógeno oportunista *Vibrio vulnificus* codifica para un total de 99 proteínas con dominios GGDEF, EAL, HD-GYP o PilZ, mientras que en el parásito obligado *Helicobacter pylori* no se ha identificado ninguna (Jenal & Malone, 2006).

Se puede considerar que las bacterias que interactúan con plantas se desarrollan en ambientes complejos y cambiantes. Estudios bioinformáticos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Prada-Ramírez, 2014), muestran que los genomas de bacterias que interactúan con plantas contienen un gran número de genes implicados en el metabolismo del segundo mensajero c-di-GMP. Paradójicamente, tan solo unos pocos genes codifican para proteínas efectoras con dominios PilZ (Tabla I.1), el único tipo de efectores que puede actualmente reconocerse por métodos bioinformáticos.

## Introducción

**Tabla I.1. Proteínas con dominios GGDEF, EAL, HD-GYP y PilZ codificadas en los genomas de diferentes especies que interactúan con plantas**

Especie	Nº genes <sup>a</sup>	EAL <sup>b</sup>	GGDEF	GGDEF/EAL	PilZ	HD-GYP
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	8317	4	12	23	9	3
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	5963	0	14	21	3	1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841	7150	0	15	22	3	7
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	6205	1	6	12	2	-
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	7275	2	16	16	2	1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	5402	1	16	13	3	1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000	5608	2	16	19	8	1
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	4472	7	13	4	2	1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. campestris	4181	4	21	10	4	3

<sup>a</sup> Número total de genes en el genoma

<sup>b</sup> excluyendo las proteínas que presentan los dos dominios en tándem

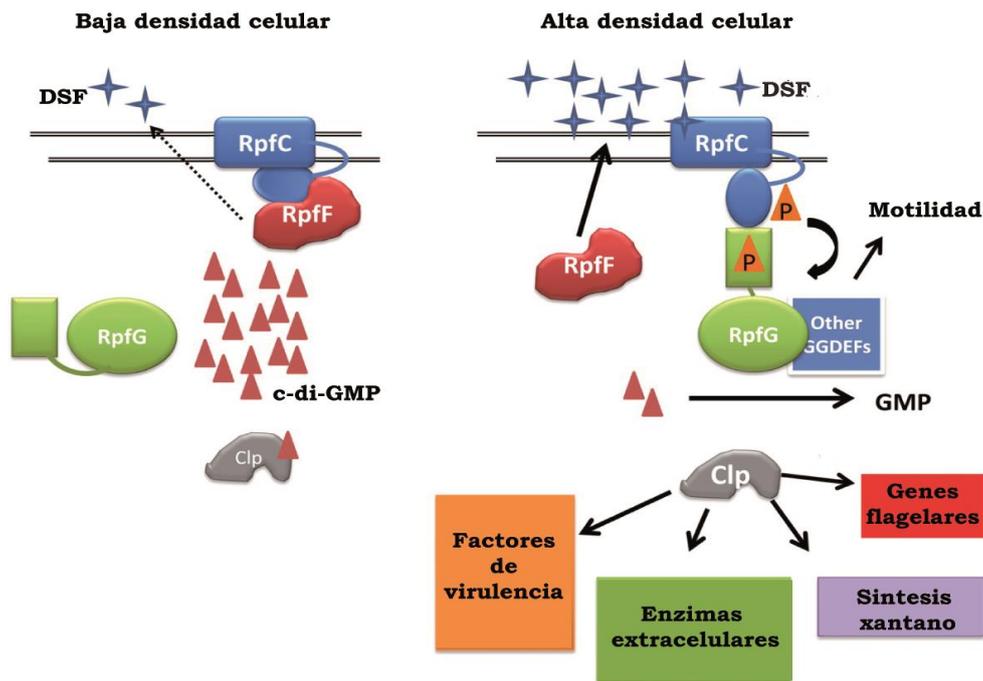
Datos recogidos de (Prada-Ramírez, 2014)

Una de las rutas de señalización por c-di-GMP mejor caracterizadas entre bacterias que interactúan con plantas la encontramos en el fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), agente causal de la podredumbre negra de las crucíferas. En esta bacteria el c-di-GMP regula la virulencia y la motilidad conectando con la señalización por *quorum sensing* (Chin *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2007).

La molécula de *quorum sensing* DSF (del inglés, *diffusible signaling factor*), es un ácido graso insaturado imprescindible para la virulencia en esta bacteria, cuya síntesis depende de la proteína RpfF. Cuando el DSF es detectado por la quinasa RpfC, ésta fosforila el dominio REC de RpfG incrementando la actividad PDE asociada a su dominio HD-GYP (Fig. I.15). RpfG afecta a la producción de factores de virulencia, como enzimas extracelulares y el polisacárido xantano, a través del factor de transcripción Clp. La interacción del c-di-GMP con Clp impide su unión con las regiones promotoras de los genes que regula, inhibiendo su transcripción. De esta forma, la reducción de los niveles de c-di-GMP por RpfG promueve la virulencia en esta bacteria.

Además, la molécula DSF también regula la motilidad tipo *twitching* en *Xanthomonas*, a través de un sorprendente mecanismo. La PDE RpfG interactúa con

dos DGC a través de un dominio DxD situado próximo al dominio GGDEF (Ryan *et al.*, 2012a). Este complejo a su vez recluta una proteína con un dominio PilZ para interactuar con las ATPasas de membrana PilT y PilU, responsables de la retracción y protrusión de los *pili* tipo IV (Ryan *et al.*, 2010). Pero lo más llamativo es que la interacción de RpfG con las dos DGC ocurre de forma independiente de la actividad DGC, ya que mutaciones en el dominio GGDEF o en el sitio inhibitorio I no afectan a su unión con RpfG (Ryan *et al.*, 2012a).



**Figura I.15. Integración del *quorum sensing* a través del segundo mensajero c-di-GMP en *Xanthomonas*.** El reconocimiento de la molécula de *quorum sensing* DSF por RpfC, promueve la actividad PDE de RpfG, disminuyendo los niveles de c-di-GMP. Esto permite que el factor de transcripción Clp pueda activar los genes responsables de la virulencia. Por otro lado, la interacción de RpfG con dos DGC y una proteína con dominio PilZ, permite el control de la motilidad tipo *twitching* de esta bacteria. Las flechas continuas representan activación, mientras que las flechas discontinuas indican una producción basal de DSF. Adaptada de Srivastava & Waters, 2012.

En numerosas especies de *Pseudomonas*, el segundo mensajero c-di-GMP regula la formación de biopelículas, la motilidad y la producción de factores de virulencia. Debido a la importancia clínica de bacterias patógenas de humanos, el estudio del c-di-GMP en este género se ha centrado fundamentalmente en *P. aeruginosa*. Sin embargo, el papel del c-di-GMP en bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) como *P. putida* o *P. fluorescens* es menos conocido.

Muchas cepas de *P. fluorescens* son agentes de biocontrol, que protegen a las plantas frente al ataque de hongos patógenos a través de la formación de biopelículas (Danhorn & Fuqua, 2007). Para la estabilidad de estas biopelículas es necesaria la adhesina LapA, responsable de la interacción irreversible con superficies. LapA se exporta a través de un sistema de secreción tipo I, pudiendo encontrarse de dos formas: i) asociada a la superficie bacteriana, promoviendo la adhesión o ii) libre en el medio. Estos dos estados de LapA dependen de su procesamiento proteolítico por la proteasa LapG, cuya localización a su vez depende de LapD, una proteína híbrida con dominios GGDEF y EAL. Este último se encuentra degenerado pero mantiene la capacidad de unir c-di-GMP. La unión del c-di-GMP al dominio EAL de LapD, provoca un cambio conformacional que culmina con el secuestro de LapG inhibiendo su actividad proteolítica y promoviendo la formación de biopelículas a través de LapA (Newell *et al.*, 2009). Estudios recientes han demostrado que la DGC GcbC interacciona directamente con la proteína efectora LapD, proporcionándole un suministro local de c-di-GMP (Dahlstrom *et al.*, 2015).

La formación de biopelículas dependientes de LapA por *P. fluorescens*, responde a la concentración de fosfato inorgánico gracias al sistema de dos componentes PhoR/PhoB. Altos niveles de fosfato van a proporcionar altos niveles de c-di-GMP a través de la inhibición de la PDE RapA (Monds *et al.*, 2007). Este sistema representa un ejemplo de señalización por c-di-GMP que ha sido elucidado a nivel molecular, desde el primer mensajero (fosfato) hasta la adhesión a superficies por LapA.

Esta cascada de transducción de señales se encuentra también presente en varias especies de *Pseudomonas*, entre ellas *P. putida* KT2440, una bacteria promotora del crecimiento de plantas además de agente de bioremediación a través de una rápida colonización de la rizosfera (Danhorn & Fuqua, 2007). Mediante un análisis genómico se han puesto de manifiesto genes implicados en el metabolismo del c-di-GMP que juegan un papel importante en la colonización de la rizosfera por esta bacteria (Matilla *et al.*, 2007). La expresión del gen PP4959, implicado en la formación de biopelículas y cuyo producto codifica para una proteína híbrida con dominios GGDEF y EAL, es inducida durante la colonización de la rizosfera de maíz por *P. putida* KT2440 (Matilla *et al.*, 2011).

---

En el fitopatógeno *Erwinia amylovora*, agente causal de la enfermedad conocida como fuego bacteriano, el c-di-GMP regula de forma positiva la producción del principal polisacárido implicado en la patogenicidad de esta bacteria, el amilovorano (Edmunds *et al.*, 2013). Sin embargo, los elevados niveles de c-di-GMP parecen afectar de forma negativa a la virulencia de esta bacteria y a la expresión de los genes del sistema de secreción tipo III (Edmunds *et al.*, 2013).

#### **4.1. Papel del c-di-GMP en la simbiosis rizobio-leguminosa**

Previo a la simbiosis, los rizobios deben alcanzar y colonizar la rizosfera, formar microcolonias sobre las raíces de leguminosas donde se desarrollaran hasta que la población sea la adecuada como para crear una concentración suficiente de factores Nod para penetrar en la raíz (Fujishige *et al.*, 2008). Estas funciones bacterianas previas al establecimiento de la simbiosis, como la motilidad, la producción de EPS, la formación de biopelículas o la señalización mediante *quorum sensing*, son fundamentales para una correcta interacción rizobio-leguminosa. Así en *S. meliloti* mutantes aflagelados incapaces de moverse presentan un retraso en el desarrollo de nódulos en plantas de alfalfa y trébol cuando estas se desarrollan en medio sólido, además de una reducida capacidad para formar biopelículas en comparación con la cepa silvestre (Fujishige *et al.*, 2006). Sorprendentes estudios en esta misma bacteria, revelaron una segunda función de los factores Nods, actuando en la interacción célula-célula. Mutantes en genes *nod*, son incapaces de formar biopelículas tridimensionales tanto en superficies abióticas como bióticas (Fujishige *et al.*, 2008). Siguiendo con *S. meliloti* y su capacidad de formación de biopelículas, también se ha comprobado que los EPS simbióticamente relevantes, succinoglucano y galactoglucano (EPSI y EPSII, respectivamente), intervienen igualmente en el desarrollo de una biopelícula tridimensional (Fujishige *et al.*, 2006; Rinaudi & Gonzalez, 2009). *R. leguminosarum* sigue esta misma tendencia, ya que mutantes con alguna alteración en la estructura o la secreción del EPS ácido, se encuentran afectados negativamente en su capacidad de formar biopelículas (Russo *et al.*, 2006). Además, mutantes de *R. etli* afectados en señalización por *quorum sensing* son incapaces de desarrollar motilidad tipo *swarming* (Daniels *et al.*, 2004; Daniels *et al.*, 2006).

Con estos ejemplos de rizobios alterados en motilidad, producción de EPS, formación de biopelículas o *quorum sensing*, se pone de manifiesto la relación existente entre estas funciones celulares y una correcta interacción simbiótica con su planta hospedadora. Como se ha descrito anteriormente, el segundo mensajero c-di-GMP controla frecuentemente estas funciones en diferentes bacterias, por lo que podría jugar un papel fundamental en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa. Sin embargo, la señalización a través de este segundo mensajero es muy poco conocida en rizobios. Recientes trabajos han ayudado a profundizar en el papel del c-di-GMP en estas bacterias y en su interacción con la planta (Ausmees *et al.*, 2001b; Gao *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*, 2015; Schäper *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2010).

Estudios llevados a cabo con *R. leguminosarum* bv. trifolii, pusieron de manifiesto que la producción de celulosa en esta bacteria depende del operón *celR1-celR2* (homólogos a los genes DivK y PleD de *C. crescentus*, respectivamente). Este fue uno de los primeros trabajos que relacionaron la producción de celulosa con la actividad DGC asociada al dominio GGDEF de CelR2 (Ausmees *et al.*, 1999; Ausmees *et al.*, 2001b).

En la bacteria modelo *S. meliloti* existen dos trabajos que recogen un estudio sistemático de las funciones relacionadas con el c-di-GMP en esta bacteria, con resultados ciertamente contradictorios (Schäper *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2010). Ambos trabajos desarrollan una estrategia genética basada en la construcción de mutantes individuales en diferentes proteínas con dominios GGDEF y/o EAL para posteriormente analizar los fenotipos regulados por c-di-GMP, como la producción de EPS, la motilidad o la formación de biopelículas, además de su implicación en la interacción con la planta hospedadora, *Medicago sativa* (alfalfa). En el primero de ellos, empleando la cepa *S. meliloti* 1021, se obtuvieron mutantes por inserción en 14 de los 19 genes que posee esta bacteria implicados en el metabolismo del c-di-GMP. Los resultados mostraron que 11 proteínas con dominios GGDEF y EAL afectan a la motilidad, la producción de EPS, el crecimiento en medio mínimo y la competitividad en raíces de alfalfa en *S. meliloti* 1021 (Wang *et al.*, 2010). No obstante, este estudio adolece del uso de mutantes por inserción cuyos fenotipos no fueron verificados por complementación genética.

El segundo estudio, mucho más completo, empleó la cepa 2011 para obtener mutantes en 19 de los 20 genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF y/o EAL; el gen SMc00074 (EAL/GGDEF) resultó ser esencial y no pudo ser eliminado (Schäper *et al.*, 2016). Ninguno de estos mutantes se encontraba afectado en motilidad, en producción de EPS ni en simbiosis con alfalfa, y solo 7 de estos mutantes presentaron diferencias en cuanto a formación de biopelículas con respecto a la cepa parental. Igualmente, una cepa carente de todas las 19 DGC, y que por tanto presenta niveles mínimos de c-di-GMP, sólo vio afectado su crecimiento en medios con pH ligeramente ácido, no observándose diferencias en nodulación con respecto a la cepa parental. Los autores sugirieron que el c-di-GMP no es esencial para *S. meliloti* ni para su interacción con *M. sativa*, al menos en las condiciones ensayadas. Aunque hay que considerar que no pudieron eliminar el gen SMc00074 y que su actividad podría determinar la producción de c-di-GMP en ciertas, quizá desconocidas, condiciones. Además, es posible que el fenotipo observado (o la aparente ausencia de fenotipo) pueda ser el resultado combinado de las múltiples mutaciones, lo que no excluye que el c-di-GMP sea importante para ciertas funciones. De hecho, en este mismo estudio también se analizaron los efectos provocados por elevados niveles de c-di-GMP al sobreexpresar 5 DGC propias de *S. meliloti* 2011, observándose los fenotipos típicos asociados a altos niveles de c-di-GMP, como inhibición de la motilidad, aumento de la producción de EPS y de la formación de biopelículas, similares a los observados previamente por Pérez-Mendoza y colaboradores (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Los autores concluyeron que la mayor producción de EPS en presencia de altos niveles de c-di-GMP, se debe a un incremento de EPS I (succinoglicano) y que las biopelículas formadas en estas condiciones dependen del polisacárido unipolar UPP, previamente caracterizado en *R. leguminosarum* y *A. tumefaciens* (Laus *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013). Estos autores no consideraron, por ejemplo, que los altos niveles de c-di-GMP provocan la sobreproducción de MLG (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015), puesto que utilizaron una cepa de *S. meliloti* carente del regulador ExpR, que controla la expresión de multitud de genes, incluidos *bgsBA*.

En *S. meliloti* 2011, los altos niveles de c-di-GMP afectan negativamente a la producción de EPS II (galactoglucano) y de AHL. Además, se identificó una proteína con un dominio PilZ, McrA, capaz de unir c-di-GMP que desempeñaría un papel similar

a YcgR de *E. coli*, inhibiendo la motilidad dependiente de flagelo (Schäper *et al.*, 2016). Este trabajo desarrollado en el grupo de la Dra. Anke Becker, constituye hasta el momento el análisis más completo, aunque todavía parcial, del papel del c-di-GMP en la bacteria modelo *S. meliloti*.

En la principal bacteria objeto de estudio de esta tesis doctoral, *Rhizobium etli*, también se ha realizado una aproximación genética para evaluar los posibles efectos del c-di-GMP en la interacción con su hospedador *P. vulgaris*. El grupo liderado por el Dr. Jan Michiels, realizó mutantes por inserción en dos genes, RHE\_PD00105 (*cdgA*) y RHE\_PD00137 (*cdgB*), que codifican para proteínas con dominios GGDEF y EAL, ambas localizadas en el plásmido simbiótico de la cepa *R. etli* CNPAF512. Mutaciones en cada uno de los genes, así como dobles mutantes, no alteraban la capacidad de colonización, la fijación de nitrógeno, la motilidad, la producción de EPS ni formación de biopelículas en esta cepa (Gao *et al.*, 2014). Los autores también sobrexpresaron CdgA y CdgB de forma independiente, aunque no observaron cambios fenotípicos destacables. Esto podría ser explicado porque CdgA y CdgB, poseen ambas actividades antagónicas DGC y PDE, lo que podría producir un efecto de neutralización en las condiciones ensayadas (Gao *et al.*, 2014). De todas formas, es bastante común que mutaciones en genes individuales no produzcan cambios fenotípicos destacables, debido a una posible redundancia funcional, sobre todo en bacterias como rizobios que poseen multitud de genes que codifican para DGCs y/o PDEs. En estos casos, puede ser más efectivo el uso de estrategias alternativas, como las que implican la alteración artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP.

# **OBJETIVOS**



---

## **OBJETIVOS**

El segundo mensajero c-di-GMP o diguanilato cíclico ha surgido en los últimos años como una molécula clave en la transición entre los estilos de vida libre o saprofítico y sedentario o en forma de biopelículas, en gran número de bacterias. De forma general, el c-di-GMP inhibe funciones relacionadas con la motilidad e inversamente promueve la formación de biopelículas a través de la producción de polisacáridos, adhesinas y otros componentes de la matriz extracelular.

Durante la colonización o invasión de una planta por parte de bacterias mutualistas o patogénicas, existe un verdadero diálogo molecular entre los organismos. Las bacterias deben percibir e interiorizar las señales vegetales para poder modificar su comportamiento y coordinar, en el tiempo y en el espacio, la expresión de genes necesarios para la interacción con la planta. El c-di-GMP es una molécula clave a la hora de interiorizar señales del medio y desencadenar las respuestas adecuadas en cada momento. Además, funciones bacterianas necesarias para la interacción con plantas como la motilidad, la producción de polisacáridos extracelulares, la formación de biopelículas en distintas superficies de las plantas, o la secreción de adhesinas y factores de virulencia, se encuentran reguladas por c-di-GMP.

Las bacterias del suelo conocidas como rizobios, establecen relaciones simbióticas con leguminosas para llevar a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno. Estas bacterias sufren importantes cambios durante su ciclo de vida, transitando desde una forma saprofítica en el suelo hasta bacteroides intracelulares, formas especializadas en la fijación de nitrógeno localizadas en el interior de las células vegetales. Durante este complejo tránsito, las bacterias han de percibir múltiples ambientes y señales químicas y responder adecuadamente a cada una de ellas, modificando su fisiología y metabolismo para que la interacción sea exitosa. Por ello, es razonable pensar que el c-di-GMP pueda ejercer un papel importante, regulando diversos cambios bacterianos, durante las interacciones rizobio-leguminosa.

Con estos antecedentes, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido explorar por primera vez los efectos del c-di-GMP sobre diversas propiedades de rizobios, incluida la interacción con plantas leguminosas, así como identificar proteínas efectoras del c-di-GMP en estas bacterias. Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

## Objetivos

---

1. Analizar el efecto de concentraciones artificialmente elevadas de c-di-GMP en distintas bacterias que interaccionan con plantas, particularmente en rizobios.
2. Determinar el papel de los EPS regulados por c-di-GMP, celulosa y  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG), en *Rhizobium etli* CFN42 en vida libre y durante la interacción con su leguminosa hospedadora, *Phaseolus vulgaris*.
3. Identificar proteínas efectoras del c-di-GMP en *R. etli* CFN42.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## I. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

### 1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se describen en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.**

Bacteria	Características relevantes	Referencias
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>SupE44, DlacU169, f80, LacZDM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Bethesda Research Laboratory
$\beta$ 2163	<i>MG1655::<math>\Delta</math>dapA::(erm-pir)RP4-2-Tc::Mu, Km<sup>r</sup>, Em<sup>r</sup></i>	(Demarre <i>et al.</i> , 2005)
$\beta$ 2155	<i>RP4-2-Tc::Mu <math>\Delta</math>dapA::(erm-pir) thrB1004, pro, thi, strA, hsdS, lacZ <math>\Delta</math>M15, (F' lacZ <math>\Delta</math>M15, lacIq, traD36, proA+, proB+) Km<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup>, Em<sup>r</sup></i>	(Demarre <i>et al.</i> , 2005)
TOP10	<i>F mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1, araD139, <math>\Delta</math>(araleu)7697, galU, galK, rpsL(Str<sup>r</sup>) endA1, nupG, electrocompetentes</i>	Invitrogen <sup>®</sup>
OmniMAX 2-T1 <sup>R</sup>	<i>F' [proAB+ lacIq lacZ<math>\Delta</math>M15 Tn10(TetR) <math>\Delta</math>(ccdAB)], mcrA, <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC), <math>\phi</math>80(lacZ), <math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169, endA1, recA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 tonA, panD</i>	Invitrogen <sup>®</sup>
BL21(DE3)	Derivada de BL21 que contiene el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i>	Novagen <sup>®</sup>
C41 (DE3)	Derivada mutante de BL21 (DE3) que se caracteriza por sobreexpresar proteínas potencialmente tóxicas	(Miroux & Walker, 1996)
C43 (DE3)	Derivada mutante de BL21 (DE3) que se caracteriza por sobreexpresar proteínas potencialmente tóxicas	(Miroux & Walker, 1996)
S17.1	<i>Thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<b><i>Sinorhizobium meliloti</i> (Sme)</b>		
Sme 8530	Cepa derivada de 1021, Expr <sup>+</sup> ( <i>expR101</i> ), Sm <sup>r</sup>	(Glazebrook & Walker, 1989)
Sme Tn7pleD*Km	Derivada de 8530 que contiene el mini-transposón mini-Tn7pleD*Km bajo el gen <i>glmS</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Sme Tn7Km	Derivada de 8530 portadora del mini-transposón mini-Tn7Km bajo el gen <i>glmS</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo

## Materiales y métodos

Sme Tn7pleD*Tc	Derivada de 8530 que contiene el mini-transposón mini-Tn7pleD*Tc bajo el gen <i>nodM</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
Sme Tn7Tc	Derivada de 8530 Tn7pleD*Tc portadora de mini-Tn7Tc bajo el gen <i>nodM</i> , Sm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
<b><i>Rhizobium etli</i> (Ret)</b>		
Ret CFN42	Cepa silvestre, Nx <sup>r</sup>	(Quinto <i>et al.</i> , 1985)
Ret Tn7pleD*	Derivada de CFN42 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*, Nx <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret Tn7pleD*Km	Derivada de CFN42 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*Km, Nx <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret Tn7Km	Derivada de Ret Tn7pleD*Km portadora de mini-Tn7Km, Nx <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret Tn7pleD*Tc	Derivada de CFN42 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*Tc, Nx <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret Tn7Tc	Derivada de Ret Tn7pleD*Tc portadora de mini-Tn7Tc, Nx <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret ΔcelAB	Derivada de CFN42 que contiene una delección de los genes <i>celAB</i> , RHE_CH01542 y RHE_CH01543 respectivamente, Nx <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret ΔbgsA	Derivada de CFN42 conteniendo una delección en fase del gen <i>bgsA</i> , RHE_PE00363, Nx <sup>r</sup>	Este trabajo
Ret ΔcelAB ΔbgsA	Derivada de Ret ΔcelAB conteniendo una delección en fase del gen <i>bgsA</i> , RHE_PE00363, Nx <sup>r</sup>	Este trabajo
<b><i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (Rle)</b>		
Rle UPM791	Derivada de 158C53, Sm <sup>r</sup>	(Leyva <i>et al.</i> , 1987)
Rle Tn7pleD*Km	Derivada de UPM791 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*Km, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Rle Tn7Km	Derivada de UPM791 Tn7pleD*Km portadora de mini-Tn7Km, Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Rle Tn7Tc	Derivada de UPM791 que portadora de mini-Tn7Tc, Sm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
<b><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (Pto)</b>		
Pto DC3000	Cepa silvestre, Rif <sup>r</sup>	(Cuppels, 1986)
Pto Tn7pleD*Km	Derivada de DC3000 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*Km, Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Pto Tn7Km	Derivada de Pto Tn7pleD*Km portadora de mini-Tn7Km, Rif <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
Pto Tn7pleD*Tc	Derivada de DC3000 que contiene el mini-transposón Tn7pleD*Tc Rif <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
Pto Tn7Tc	Derivada de Pto Tn7pleD*Tc portadora de mini-Tn7Tc, Rif <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos empleados.

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pJB3Tc19	Vector de clonación IncP derivado de RK2, Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	(Blatny <i>et al.</i> , 1997)
pJBpleD*	Derivado de pJB3Tc19, que contiene un fragmento EcoRI-XbaI de 1,4Kb del gen <i>pleD</i> * de <i>Caulobacter crescentus</i> .	(Pérez-Mendoza <i>et al.</i> , 2014)
pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup>	Vector de clonación para productos de PCR, Km <sup>r</sup>	Invitrogen <sup>®</sup>
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Vector de clonación para productos de PCR Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Invitrogen <sup>®</sup>
pTOPO-pleD*	Derivado de pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> con un fragmento de 1,7 Kb que contiene el gen <i>pleD</i> *	Este trabajo
pUC18T-mini-Tn7T	Vector de clonación derivado de pUC18 portador del transposón mini-Tn7, <i>ori</i> ColE1, Ap <sup>r</sup>	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
mini-Tn7pleD*	Derivado de pUC18T-mini-Tn7T con un fragmento SacI-EcoRI que contiene el gen <i>pleD</i> *, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
mini-Tn7pleD*Km	Derivado de mini-Tn7pleD* con un fragmento KpnI de 1,2 Kb que confiere resistencia a Kanamicina, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
mini-Tn7Km	Derivado de mini-Tn7pleD*Km con una delección interna NcoI de 1114 pb del gen <i>pleD</i> *, Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
mini-Tn7pleD*Tc	Derivado de mini-Tn7pleD* con un fragmento KpnI de 1,3 Kb que confieren resistencia a Tetraciclina, Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
mini-Tn7Tc	Derivado de mini-Tn7pleD*Tc con una delección interna NcoI de 1114 pb del gen <i>pleD</i> *	Este trabajo
pUX-BF13	Plásmido portador de los genes de la transposasa <i>tnsABCDE</i> , <i>ori</i> R6K, Ap <sup>r</sup>	(Bao <i>et al.</i> , 1991)
p34S-Tc	Vector portador de un gen de resistencia a Tetraciclina, Tc <sup>r</sup>	(Dennis & Zylstra, 1998)
p34S-Km	Vector portador de una gen de resistencia a Kanamicina, Km <sup>r</sup>	(Dennis & Zylstra, 1998)
pBBR1MCS-5	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, Gm <sup>r</sup> , Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1lacI <sup>q</sup>	Derivado de pBBR1MCS-5 portador del gen <i>lacI</i> <sup>q</sup>	Este trabajo
pK18mobSacB	Vector suicida, Km <sup>r</sup>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18ΔcelAB	Derivado de pK18mobSacB que contiene la versión delecionada de los genes <i>celAB</i> , Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pK18ΔbgsA	Derivado de pK18mobSacB que contiene la versión delecionada del gen <i>bgsA</i> , RHE_PE00363, Km <sup>r</sup>	Este trabajo

## Materiales y métodos

TOPO $\Delta$ celAB	Derivado de pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> que contiene la versión delecionada de los genes <i>celAB</i> , Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
TOPO $\Delta$ bgsA	Derivado de pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> que contiene la versión delecionada del gen <i>bgsA</i> , RHE_PE00363, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE-80L	Vector de expresión para obtener proteínas marcadas en el extremo N-terminal con 6xHis, <i>lacI<sup>q</sup></i> , Ap <sup>r</sup>	Quiagen <sup>®</sup>
pQE80-glmU	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 1365 pb que contiene el gen <i>glmU</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-dgt	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 1227 pb que contiene el gen <i>dgt</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-surE	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 777 pb que contiene el gen <i>surE</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-nrdR	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 480 pb que contiene el gen <i>nrdR</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-alla	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 507 pb que contiene el gen <i>alla</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-pgi	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/KpnI de 1633 pb que contiene el gen <i>pgi</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-clpX	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 1281 pb que contiene el gen <i>clpX</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-TolB	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 1314 pb que contiene el gen <i>tolB</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-aroA	Derivado de pQE-80L con un fragmento SacI/HindIII de 1262 pb que contiene el gen <i>aroA</i> de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-celPilZ	Derivado de pQE80L con un fragmento BamHI/HindIII de 528 pb perteneciente al dominio PilZ de la proteína CelA de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-1767	Derivado de pQE-80L con un fragmento SacI/HindIII de 573 pb que contiene el gen RHE_CH01767 de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pQE80-2207	Derivado de pQE-80L con un fragmento BamHI/HindIII de 621 pb que contiene el gen RHE_CH02207 de Ret, Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pET-28b(+)	Vector de expresión para el marcaje de proteínas con 6xHis tanto en el N-terminal como en el C-terminal, Km <sup>r</sup>	Novagen <sup>®</sup>
TOPOcelA	Derivado de pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> que contiene un	Este trabajo

pET28celA	fragmento de 2270 pb perteneciente al gen <i>celA</i> de Ret, Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> Derivado del vector de expresion pET-28b(+) con un fragmento SacI/NotI de 2248 pb que porta el gen <i>celA</i> de Ret fusionado a la marca 6xHis por el extremo N-terminal, Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pET21:PA3353	Derivado del vector de expresion pET-21a(+) con un fragmento NdeI/XhoI que contiene el gen PA3353 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> fusionado a la marca 6xHis por el extremo C-terminal	(Düvel <i>et al.</i> , 2012)
pET21:phoB	Derivado del vector de expresion pET-21a(+) que porta el gen <i>phoB</i> de <i>P. aeruginosa</i> fusionado a la marca 6xHis por el extremo C-terminal	

## **1.2 Medios de cultivo**

### ***1.2.1 Medios de cultivo para E. coli y Pseudomonas***

Las cepas de *E. coli* y *Pseudomonas* se cultivaron de forma rutinaria a 37°C y 28°C, respectivamente, tanto en medio sólido como líquido, utilizando el medio Luria-Bertani (LB), cuya composición es la siguiente:

NaCl.....	5 g
Triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Agar (para medio sólido).....	15 g
Agua desionizada.....	1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120° durante 20 minutos.

### ***1.2.2 Medios de cultivo para Rhizobium y Sinorhizobium***

Las cepas de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* se cultivaron de forma rutinaria a 28-30°C. *Rhizobium etli* y *Sinorhizobium meliloti* se crecieron en medio completo TY (Beringer, 1974) cuya composición es la siguiente:

Triptona .....	5 g
Extracto de levadura .....	3 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Agar (para medio sólido).....	15 g

Agua desionizada ..... 1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120° durante 20 min.

Como medio completo para el crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* se empleó medio YGT, cuya composición se detalla a continuación:

Glucosa..... 15g  
Triptona..... 5g  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O..... 0.6g  
Extracto de levadura..... 2.5g  
Agar (para medio sólido).....,..... 15g  
Agua desionizada.....1000 ml

Como medio mínimo (MM) para los rizobios y *Pseudomonas* se ha empleado el de (Robertsen *et al.*, 1981) modificado según se especifica a continuación:

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0,3 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 0,3 g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 0,15 g  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O..... 0,05 g  
FeCl<sub>3</sub>..... 0,006 g  
NaCl..... 0,05 g  
Glutamato sódico..... 1,1 g  
Manitol..... 10 g  
Solución de vitaminas\*..... 1 ml  
Agar purificado (medio sólido)..... 13 g  
Agua desionizada..... 1000 ml

\* La solución concentrada de vitaminas (1000x) consta de:

Biotina..... 0.2 g  
Clorhidrato de tiamina..... 0.1g  
Pantotenato sódico..... 0.1g  
Agua desionizada..... 1000 ml

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 ml/litro al medio mínimo previamente autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

Para la realización de los *microarrays* en *R. etli* se empleó medio PY para el crecimiento de los precultivos, y Medio Mínimo Y (MMY) (Bravo & Mora, 1988) para los cultivos principales. La composición de ambos medios es la siguiente:

Medio PY

Peptona de caseína.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O .....	0.98 g
Agua desionizada.....	1000 ml

Medio MMY

Acido succínico.....	1.18 g
NH <sub>4</sub> Cl.....	0.534 g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.22 g

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH y esterilizar en el autoclave a 120°C por 20 minutos. Suplementar el medio, una vez enfriado, con CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O estéril (concentración final 1.5 mM) y con FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O previamente filtrado (concentración final 0.019 mM).

Para los ensayos de motilidad tipo *swimming* se utilizó el medio Bromfield semisólido (MB) (Nogales *et al.*, 2012).

Triptona.....	0.4g
Extracto de levadura.....	1g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.1g
Agar Bacteriológico.....	3g
Agua desionizada.....	1000 ml

Para los ensayos de motilidad tipo *swarming* se empleó MM con una concentración de agar purificado del 0.6%.

Cuando fue necesario, se añadió al medio ácido diaminopimélico (DAPA) a una concentración final de 0,3 mM e isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final dentro de un rango de 50 a 1000 μM. Ambos fueron preparados en agua, esterilizados mediante filtración y conservados a - 20°C.

### **1.3 Antibióticos**

Los antibióticos se prepararon como soluciones 100 veces concentradas y se esterilizaron por filtración mediante unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0.2 µm de tamaño de poro. Todos los antibióticos fueron disueltos en agua excepto la tetraciclina que se disolvió en metanol. Las concentraciones finales empleadas se indican en la tabla 3.

**Tabla 3. Concentración de antibióticos usados.**

Antibiótico	Concentración (µg/ml)				
	<i>E. coli</i>	<i>Ret</i>	<i>Rle</i>	<i>Sme</i>	<i>Pto</i>
Sulfato de kanamicina (Km)	50	50	50	200	50
Sulfato de estreptomicina (Sm)	50	100	-	200	-
Ampicilina (Ap)	200	-	-	-	-
Tetraciclina (Tc)	10	5	5	10	10
Gentamicina (Gm)	30	30	30	30	30
Rifampicina (Rf)	-	-	-	-	10
Ácido nalidíxico (Nx)	-	20	-	-	-

### **1.4. Conservación de cepas bacterianas**

Para la conservación prolongada de las distintas cepas, cultivos bacterianos en fase exponencial fueron incluidos en criotubos con cierre hermético, adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 20% y conservados a -80°C.

### **1.5. Conjugaciones biparentales o triparentales**

Esta técnica se empleó para la introducción de plásmidos a distintas cepas bacterianas. Se realizó mediante la mezcla de células de cultivos en fase logarítmica de donadores (*E. coli* S17.1, β2163 o β2155), con células en fase exponencial tardía del receptor en la misma proporción (1:1). La mezcla de los cultivos se centrifugó en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se lavó varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo del receptor) con el fin de eliminar los restos de antibióticos. Posteriormente la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (40 µl) de medio de cultivo y se depositó en un filtro Milipore estéril de 0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio TY sólido (adicionado con

ácido di-aminopimélico, DAPA cuando el donador fue *E. coli*  $\beta$ 2163 o  $\beta$ 2155). Los filtros se incubaron durante 18-24 horas a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa receptora. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril y se prepararon diluciones seriadas que se sembraron sobre placas de medio selectivo.

### **1.6. Ensayos de motilidad *swimming***

Para el estudio de motilidad tipo *swimming* se utilizó un protocolo descrito previamente (Nogales *et al.*, 2012), las distintas cepas se cultivaron en agitación en medio líquido completo, se igualaron las densidades ópticas y alícuotas de 3  $\mu$ l de cada cultivo se pincharon en el interior del medio de placas de Petri que contenían 25 mL de medio Bromfield (0.3% de agar). Tras la colocación de las muestras se incubaron en la estufa a 28°C y se les hizo el seguimiento del crecimiento a partir de las 24 horas. La motilidad se expresó como la media del diámetro del halo de dispersión de la colonia  $\pm$  el error típico, a partir de los datos de 3 réplicas biológicas.

### **1.7. Ensayos de motilidad tipo *swarming***

Para el estudio del movimiento en superficie se empleó un protocolo descrito previamente (Soto *et al.*, 2002). Para ello, cultivos líquidos en medio rico de las distintas cepas fueron crecidos en agitación hasta una D.O. de 1. Posteriormente 1 ml de cultivo se centrifugó y se lavó dos veces con MM. El *pellet* celular se resuspendió en 100  $\mu$ l de MM, y alícuotas de 2  $\mu$ l de esta suspensión se colocaron sobre la superficie de placas Petri conteniendo 20 ml de MM semisólido (agar 0.6%) secadas durante 15 minutos. Tras la colocación de la gota, ésta se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las placas se incubaron a 28°C y se les realizó el seguimiento del crecimiento y motilidad a partir de las 24h. La motilidad se expresó como la media de la longitud en centímetros de cada uno de los lados del hipotético rectángulo que engloba la colonia. Se realizaron al menos 3 réplicas independientes con 3 réplicas biológicas a los que se les aplicó el error típico.

### **1.8 Ensayos de formación de biopelículas**

Para evaluar la capacidad de formación de biopelículas sobre superficies abióticas se empleó un protocolo basado en el previamente descrito por O'Toole y colaboradores

(O'Toole *et al.*, 1999) y posteriormente por Pérez-Mendoza y colaboradores (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Para ello, las bacterias fueron resuspendidas desde placas de MM con sus respectivos antibióticos. Tras lavar con MM líquido se midió la DO<sub>600</sub> de las suspensiones celulares, para posteriormente diluirlas hasta 0.1 DO<sub>600</sub>. 200 µl de esta resuspensión fueron colocados en cada micropocillo de placas estériles de poliestireno de 96 pocillos (Sarstedt). Las placas fueron selladas con una membrana de rayón blanco que permite la difusión del oxígeno (Axygen) y se dejaron crecer por 3 días en un ambiente húmedo a 28°C. Transcurrido este tiempo se eliminó el cultivo mediante aspiración y se lavó cada pocillo con 240 µl de agua desionizada. Los pocillos se tiñeron con 240 µl de una solución de Cristal Violeta (CV) al 0.1% en agua durante una hora. El CV fue eliminado por aspiración y cada pocillo se lavó tres veces sucesivas con 240 µl de agua desionizada. La biopelícula adherida se disolvió al añadir 240 µl de etanol 70% a cada pocillo durante una hora en agitación suave. A continuación se procedió a la cuantificación de la absorbancia a 550 nm en un lector de placas Eon (BioTeK).

### **1.9. Determinación de la producción de exopolisacáridos mediante tinción con rojo Congo y calcoflúor**

#### ***1.9.1. Producción de exopolisacáridos sobre medio sólido***

La producción de polisacáridos extracelulares se puede poner de manifiesto mediante el crecimiento de las bacterias en medio adicionado de colorantes, como el rojo Congo (CR) o el calcoflúor (CF). El CR une unidades D-glucopiranosil de polisacáridos neutros o básicos, así como algunas proteínas, mientras que el CF es más específico, uniéndose a enlaces glucosídicos β (1-3) y β (1-4), como los de la celulosa o el curdlan (Spiers *et al.*, 2002; Teather & Wood, 1982).

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 125 µg/ml. El CF se añadió al medio fundido caliente para facilitar su disolución, a una concentración final de 200 µg/ml. Tras el crecimiento de las bacterias las placas con CF se observaron bajo luz UV. Para fotografiar las placas tanto de CR como de CF se utilizó una cámara fotográfica Olympus E-420.

### ***1.9.2. Cuantificación de la producción de exopolisacáridos en medio líquido.***

Para determinar de forma cuantitativa la unión a calcoflúor de los exopolisacáridos producidos, se partió de un pre-inóculo en medio rico en fase estacionaria, tras dos lavados con MM se inocularon matraces de 10 ml (dilución 1:100) de MM suplementado con CF a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante 48h a 28°C para los rizobios y 24h a 20°C para *Pseudomonas*. Una vez transcurrido este tiempo, se recogieron los cultivos y se centrifugaron a 4000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con los restos de CF no unidos y se resuspendieron las bacterias en agua destilada hasta completar un volumen de 2 ml. Esta resuspensión se colocó en placas de 24 pocillos (Nunc<sup>®</sup>) para su medida en un fluorímetro *PTI* (Photon Technology International) utilizando una pareja de filtros de excitación/emisión de 365/450 nm. Se llevaron a cabo medidas de 3 réplicas biológicas de tres experimentos independientes de cada cepa, expresando los resultados en unidades arbitrarias  $\pm$  error típico.

## **II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **2.1. Aislamiento de ADN plasmídico**

Según requerimientos y necesidades se han utilizado dos métodos distintos:

#### ***2.1.1. Minipreparación mediante lisis alcalina***

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989) que consiste en los siguientes pasos:

1. Inocular la cepa portadora del plásmido en 4 ml de medio líquido adicionado con los antibióticos correspondientes e incubar a la temperatura óptima para cada cepa durante 12-24 horas.
2. Centrifugar las células en tubos de microcentrifuga (1,5 ml) a 12.000 rpm 1 minutos. Retirar el sobrenadante.
3. En el caso de los rizobios resuspender en 200  $\mu\text{l}$  de Sarcosil 0,1% en TE para eliminar los polisacáridos. Centrifugar las células a 12.000 rpm 1 minutos. Eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender en 100  $\mu\text{l}$  de solución I y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Añadir 200  $\mu$ l de solución II y mezclar por inversión rápida 3 veces. Dejar en hielo 5 minutos.
6. Añadir 150  $\mu$ l de solución III fría y mezclar suavemente varias veces por inversión. Dejar en hielo 5 minutos.
7. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm.
8. Recoger el sobrenadante y añadir un volumen (400  $\mu$ l) de una mezcla de fenol:cloroformo (1:1). Agitar con vórtex y centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm.
9. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo . Añadir 2,5 volúmenes de etanol 100% preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mezclar por inversión y dejar a  $-80^{\circ}\text{C}$  al menos 30 minutos.
10. Centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm. Retirar el sobrenadante.
11. Añadir 200  $\mu$ l de etanol 70% preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
12. Secar el precipitado al vacío entre 5-10 minutos aproximadamente.
13. Resuspender el precipitado en 25-50  $\mu$ l de tampón TE o agua MilliQ. Conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Soluciones:**

- **Solución I**  
Glucosa 50 mM  
EDTA 10 mM  
Tris-HCl 25 mM pH 8  
Lisozima, 4mg/ml
- **Solución II**  
NaOH 0,2 M  
SDS 1%
- **Solución III**  
Acetato potásico 5 M (60 ml)  
Ácido acético glacial (11,5 ml)  
H<sub>2</sub>O (28,5 ml); pH 4,5.
- **Tampón TE**  
Tris 10 mM

EDTA 1 mM, pH 8,0

- **Mezcla fenol:cloroformo (1:1):** El cloroformo es una mezcla de alcohol isoamílico: cloroformo (1:24). El fenol contiene fenol al 100% (1:1), 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0).

### ***2.1.2. Minipreparación de ADN plasmídico con el kit Genelute plasmid (SIGMA).***

Este método se utilizó cuando se requería una mayor calidad y pureza del ADN. Se procedió siguiendo las indicaciones del fabricante:

1. Inocular la bacteria en 4 ml de medio líquido suplementado con los correspondientes antibióticos e incubar a la temperatura adecuada para cada cepa toda la noche.
2. Resuspender las células en 200 µl de solución de resuspensión.
3. Añadir 200 µl de solución de lisis. Mezclar por inversión. Dejar a temperatura ambiente un máximo de 5 minutos.
4. Añadir 350 µl de solución de neutralización (S3). Mezclar por inversión varias veces.
5. Centrifugar 10 min. a 12.000 rpm para separar los restos celulares.
6. Para acondicionar la columna, añadir 500 µl de la solución de preparación de columna a una columna previamente colocada sobre un tubo recolector.
7. Centrifugar 1 minuto a 12.000 rpm y eliminar el filtrado.
8. Transferir el lisado a la columna, centrifugar 1 min. y eliminar el filtrado.
9. Lavar la columna con 500 µl de la solución opcional de lavado de columna, colocar en un tubo y centrifugar 1 min. a 12.000 rpm. Eliminar el eluido.
10. Añadir a la columna 750 µl de solución de lavado, centrifugar durante 1 minuto y eliminar el eluido.
11. Centrifugar 1 minuto para secar bien la columna.
12. Transferir la columna a un nuevo tubo, añadir 50-100 µl de agua MilliQ y centrifugar 1 minuto para recoger el ADN.

### **2.2. Aislamiento de ADN genómico total**

Se utilizó el kit comercial RealPure Extracción de ADN genómico (Real). Los pasos recomendados por el fabricante son los siguientes:

1. Inocular la bacteria en 3 ml de medio de cultivo líquido suplementado con los antibióticos necesarios e incubar toda la noche a la temperatura óptima para cada bacteria.
2. Centrifugar 1 ml del cultivo durante un minuto a 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 600 µl de la solución de lisis y resuspender con ayuda de la pipeta.
4. Incubar a 80°C durante 5 minutos para que se lisen las células.
5. Añadir 3 µl de RNasa al lisado y mezclar por inversión e incubar a 37°C entre 15-60 min.
6. Añadir 300 µl de la solución de precipitación de proteínas. Mezclar mediante agitación con vórtex durante 20-30 segundos.
7. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min.
8. Recoger el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo que contenga 600 µl de isopropanol 100% y mezclar varias veces por inversión.
9. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos y desechar el sobrenadante.
10. Añadir 600 µl de etanol al 70% (vol:vol) y mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 12.000 durante 2 minutos y secar en bomba de vacío.
12. Añadir 100-200 µl de agua MilliQ e incubar a 65°C durante 60 minutos para resuspender el ADN.

### **2.3 Determinación de la concentración de ADN**

Se han seguido de forma alternativa dos métodos para determinar la concentración de ADN en solución acuosa. En primer lugar a través del Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad), un espectrofotómetro UV-visible que permite cuantificar rápidamente ADN, ARN, otros ácidos nucleicos marcados y proteínas con un consumo muy reducido de muestra (2 µl). La concentración se determina respecto a los valores estándar de  $A_{260\text{nm}}$  de 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble. La relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  se usa para estimar la pureza y la calidad, considerándose valores inferiores a 1,8 y superiores a 2,2 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. El otro

método empleado ha sido descrito por Sambrook *et al.* (1989), consistente en la comparación de fluorescencia de fragmentos de ADN en gel de agarosa bajo luz UV, frente a marcadores de ADN de concentración conocida.

#### **2.4 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 de incubación, recomendadas por los proveedores (Roche® y New England Biolabs®).

#### **2.5 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo según Sambrook y colaboradores (1989), utilizando geles de agarosa sumergidos preparados en tampón TBE (Tris 50 mM; EDTA-Na<sub>2</sub> 2,5 mM; BO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 50 mM; pH 8,2) que fue también el tampón de electroforesis. La concentración de agarosa estándar fue del 0,8%, empleándose una concentración del 2% para fragmentos más pequeños. El voltaje usual que se empleo fue 90 V en cubetas de electroforesis Bio-Rad. Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada.

#### **2.6. Revelado de geles y fotografía**

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los mismos en agua destilada que contenía una solución de GelRed™ (Biotium) (100 µl/L) durante 30-40 minutos aproximadamente. Posteriormente se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) (260 nm) en un transiluminador. Para la visualización e impresión se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes y el analizador de imágenes Quantity One de Bio-Rad.

#### **2.7. Estimación del tamaño molecular de fragmentos de restricción**

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado mediante la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo del tamaño molecular relativo de moléculas patrón de ADN frente a la movilidad relativa (Rf) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcador de tamaño molecular se han

utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con HindIII (Marcador II, Fermentas™).

### **2.8. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa con cristal violeta (CV)**

Para la purificación de fragmentos de ADN se empleó el método de electroelución descrito por Sambrook y colaboradores (1989) mediante el uso de membranas de diálisis con algunas modificaciones.

La membrana de diálisis utilizada fue de Spectra/Por (SPECTRUM Medical Industries) con un tamaño de poro de 12.000 a 14.000 Da. Las membranas se prepararon sumergiéndolas en un volumen abundante de una solución que contiene bicarbonato sódico 2% (p/v) y EDTA 1 mM, y llevándolas a ebullición durante 10 minutos. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua desionizada y se conservaron en etanol 20% a 4°C. Previo a su uso, las membranas se enjuagaron con agua desionizada para retirar los restos de etanol. El proceso de electroelución fue el siguiente:

1. Añadir 1 µl de una solución de cristal violeta (CV) preparada a 2 mg/ml por cada ml de agarosa previamente fundida en un horno microondas. Dejar solidificar el gel y correr las muestras como se ha descrito en el apartado 2.5.
2. Cortar la banda del gel que contiene el ADN de interés, e introducirlo en la membrana de diálisis sellada previamente en uno de sus extremos con una pinza.
3. Añadir 400 µl de TBE (ver apartado 2.5) y cerrar el otro extremo de la membrana con una segunda pinza, intentando eliminar las burbujas de aire.
4. Colocar la membrana con el trozo de agarosa en una cubeta de electroforesis y aplicar un voltaje de 120 voltios durante 20 minutos. La banda de agarosa debe de quedar paralela al frente de corrida.
5. Invertir la polaridad durante 1 minuto a 80 voltios. Recoger la solución de TBE con el ADN y colocarla en un tubo eppendorf.
6. Precipitar el ADN añadiendo 40 µl de acetato sódico 3M pH 5,2 y 1 ml de etanol 100%.
7. Agitar por inversión y dejar 20 minutos a -80°C.

8. Centrifugar 45 minutos a 12.000 rpm a una temperatura de 4°C y eliminar el sobrenadante.
9. Lavar con etanol 70% (300 µl) y centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm. Retirar el sobrenadante.
10. Secar el precipitado al vacío y resuspender en 25 µl de agua Milli-Q.

### **2.9. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación**

La ligación de un fragmento de ADN y un vector de clonación adecuado se realizó empleando una relación molar de al menos 1:3 vector:inserto y una cantidad total de unos 200 ng, independientemente de que los extremos de los ADNs a ligar fuesen romos o cohesivos. En un tubo eppendorf de 1,5 ml se mezcló:

- X µl de ADN del vector
- Y µl de ADN del inserto
- 1 µl de ligasa del fago T4 (1 unidad/ µl, Roche)
- 2 µl de tampón de ligasa (10X)
- Agua desionizada (completando hasta 20 µl)

La mezcla se incubó a 16°C en un termo durante toda la noche.

### **2.10. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción con tampón de PCR (10x), Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM, dNTPs 0,3 mM, 50 pmol de cada cebador, 10-50 ng de ADN molde y 2 unidades de la enzima *Taq* polimerasa (EuroTaq de EuroClone<sup>®</sup> o Q5<sup>®</sup> High fidelity de New England Biolabs) en un volumen final de 25 µl. Para el proceso se utilizó un termociclador Thermo (Electron Corporation) con un programa básico consistente en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 30 segundos), anillamiento del cebador (58-60°C dependiendo de la secuencia del cebador, 30 segundos) y extensión (74°C, 1 minuto por kilobase) y finalmente, un último ciclo de extensión (74°C, 8 minutos).

### **2.11. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli***

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se siguió el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (1989):

1. A partir de un cultivo en fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> entre 0.4-0.6) pre-enfriado en hielo, se hacen tres rondas de centrifugación (4.000 rpm a 4°C durante 10 minutos) y resuspensión del pellet en volúmenes decrecientes de agua desionizada estéril. Con este paso se pretende eliminar las sales del medio de cultivo.
2. Finalmente, el pellet se resuspendió en glicerol 10% en agua (vol:vol) y las células se repartieron en alícuotas de 80 µl para su posterior conservación a -80°C.

### **2.12. Transformación bacteriana**

La transformación bacteriana con el ADN plasmídico de interés se realizó utilizando el método de electroporación. El protocolo a seguir fue el siguiente: se tomaron alícuotas de células electrocompetentes y se descongelaron en hielo. Se añadieron 2 µl (entre 20-50 ng) de ADN y esta mezcla se dejó reposar 5 minutos en hielo. Posteriormente se recogió la mezcla células/ADN y se depositó en una cubeta de electroporación de 1mm Bridge™ previamente enfriada. Esta cubeta fue sometida a un pulso eléctrico utilizando un electroporador Electro Cell Manipulator® 600 en las siguientes condiciones:

Modalidad:	T	2,5Kv/Resistencia a alto voltaje (HV)
Capacitancia:	C	No usada en modo HV
Resistencia:	R	R5 (129 ohm)
Carga:	S	1,3-1,5 Kv
Duración del pulso:	t	5-6 mseg.

Tras el pulso, se añadió inmediatamente 1 ml de LB estéril y se incubó a 37°C en agitación durante 60-90 minutos. Después de este tiempo se sembraron distintas diluciones en placas de LB sólido adicionado con los antibióticos correspondientes.

### **2.13. Secuenciación de ADN de doble cadena**

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9600 utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el servicio de secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar se le adicionó el cebador específico a 6.4 picomoles y agua MilliQ hasta un volumen final de 12  $\mu$ l.

### **2.14. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas**

Para los análisis de secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos de lectura abiertos (ORFs), búsqueda de motivos etc., se han utilizado los siguientes programas o paquetes informáticos: Vector NTI<sup>®</sup>, BLAST, HHpred y Phyre2. Los bancos de datos consultados fueron Genbank a través del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), STRING (<http://string-db.org/>), PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) y Rhizobase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>)

### **2.15. Hibridación ADN-ADN (Southern blotting)**

#### ***2.15.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon***

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Southern (Southern, 1975). Para ello:

1. Realizar la electroforesis en gel de agarosa 0,8% a bajo voltaje por tiempo prolongado para conseguir separar adecuadamente todos los fragmentos procedentes de la digestión del ADN genómico con las enzimas utilizadas.
2. Tinción del gel con GelRed<sup>®</sup> (Biotum) y fotografía del mismo.
3. Depurinación ácida del ADN: sumergir el gel en HCl 0,25 durante 20 minutos dos veces, hasta que el azul de bromofenol vire a amarillo. Lavar con agua destilada 3 veces.
4. Desnaturalización alcalina del ADN por inmersión del gel en una solución NaOH 0,5 M NaCl 1,5M durante 20 minutos. Realizar dos veces y posteriormente lavar con agua destilada.

5. Neutralización del ADN: sumergir el gel en Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 15 minutos 2 veces. Retirar y lavar con agua destilada.
6. Lavar con 10X SSC 2 minutos.
7. Humedecer una membrana de nylon cargada positivamente (Roche<sup>®</sup>) del tamaño del gel en 10X SSC durante al menos 5 minutos. Recortar dos piezas de papel Whatman 3mm del mismo tamaño y otra de mayor tamaño del gel y saturarlas en SSC 10X.
8. Sobre un cristal se construye una unidad de transferencia compuesta (de abajo a arriba) por una pieza de papel Whatman (cuyos extremos, a modo de mecha, se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia 10X SSC), el gel, la membrana de nylon y las dos piezas restantes de papel Whatman. Se colocan varias piezas de papel absorbente sobre el sistema y un marco de plástico que rodee la base del sistema. Sobre todo el conjunto se coloca una placa de vidrio y sobre esta un peso de aproximadamente 1 Kg para hacer presión en el sistema, verificando que quede totalmente horizontal. La transferencia se prolonga durante toda una noche. Finalizado este proceso se lava la membrana con SSC 2X durante 5 minutos, se deja secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se fija el ADN a la membrana mediante calentamiento en vacío a 120°C 30 minutos.

### **Soluciones:**

- **SSC 20x:**
  - 175,3 g de NaCl
  - 8,2 g de citrato sódico
  - 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada
  - Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.

### ***2.15.2 Preparación de sondas de ADN no radioactivas***

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radioactivo de marcaje con digoxigenina comercializado por Roche<sup>®</sup>, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utilizó el ADN molde (previamente digerido con enzimas de restricción) desnaturalizado por calor

(100°C, 10 minutos) y enfriado rápidamente en hielo, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa, y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante una reacción inmunológica específica. La cantidad de ADN empleada fue de 1 µg aproximadamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 1-20h.

### **2.15.3. Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radiactivas**

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó de la manera que se describe a continuación:

1. Prehibridación: mantener la membrana de nylon en 30 ml de solución de prehibridación en horno a 42°C durante un mínimo de 2 horas.
2. Hibridación: tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda previamente desnaturalizado por calor (100°C durante 10 minutos) y enfriado rápidamente en hielo. Incubar durante 6 horas a 42°C.
3. Tras la hibridación se realizaron los siguientes lavados: dos de 5 min en 100 ml de 2X SSC y SDS 0,1% a temperatura ambiente y dos de 15 min en 100 ml de SSC 0,1% y SDS 0,1% a 68°C.
4. Lavar 5 minutos con tampón de lavado a temperatura ambiente.
5. Incubar en 60 ml de tampón II durante 30 min.
6. Detección inmunológica: incubar 30 minutos con anticuerpos antidioxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche®) diluidos 1:10000 en tampón II.
7. Descartar el tampón II y añadir la dilución con el anticuerpo durante 30 min.
8. Tirar la solución y lavar dos veces con tampón de lavado durante 15 min.
9. Incubar con 40 ml de tampón III durante 5 minutos.
10. Incubar la membrana en 10 ml de CSPD (Roche®) (1:100 en tampón III) durante 3 min, evitando la incidencia de la luz.
11. Envolver la membrana en plástico transparente e incubar a 37°C 15 min.
12. Exponer la membrana a una película autorradiográfica (Kodak® X-Omat). El tiempo de exposición (30 minutos a 6 horas) varía en función de la concentración de ADN, el % de homología con la sonda y la eficiencia del marcaje.

13. Para el revelado de las películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL a las diluciones y tiempos recomendados por la casa comercial.

#### 2.15.4. Soluciones

➤ **Solución de prehibridación**

SSC 5x

Formamida 50%

Reactivo de bloqueo 2% (p/v) (Roche)

N-lauryl-sarcosina 0,1%

SDS 0,02%

➤ **Tampón I**

Ácido maléico ..... 11 g/l

NaCl..... 8,7 g/l

NaOH..... 8 g/l

➤ **Tampón II**

Tampón I

Reactivo de bloqueo 1%

➤ **Tampón III**

Tris-HCl 100 mM (pH 9,5)

NaCl 100 mM

➤ **Tampón de lavado**

Tampón 1

Tween 20 0,3%

#### **2.16. Aislamiento de ARN total**

La extracción de ARN total se realizó utilizando el kit RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit de Qiagen. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1. Centrifugar a 13.000 rpm 1,5 ml de cultivo bacteriano en tubos eppendorf durante 3 min.
2. Eliminar el sobrenadante y rápidamente introducir el sedimento en nitrógeno líquido. Posteriormente guardar la células a -80°C.
3. Una vez descongeladas las células, añadir 100 µl de lisozima (preparada en TE 1 mg/ml). Dejar a temperatura ambiente 5 min.

4. Adicionar 350 µl de tampón RLT con β-mercaptoetanol, mezclar por vórtex y centrifugar 2 min a 13.000 rpm.
5. Pasar el sobrenadante a otro tubo y añadir 250 µl de etanol 100%.
6. Se pasan las muestras a través de las columnas y se centrifuga a 13.000 rpm 30 segundos.
7. Lavar cada columna con 700 µl de tampón RW1.
8. Pasar la columna a un nuevo tubo, adicionar 500 µl de RPE y centrifugar 30 s. Volver a añadir otros 500 µl de RPE y centrifugar 30 s.
9. Retirar el líquido y centrifugar 2 min para secar la columna.
10. Pasar la columna a tubos nuevos y añadir 60 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa. Se deja un minuto para que se hidrate la resina y se centrifuga 1 min a 13.000 rpm. Se vuelven a adicionar 60 µl y se centrifuga 1 minuto a 13.000 rpm.
11. Para la eliminación de cualquier resto de ADN se procedió a digerir las muestras con DNasa (3 unidades/ µl). La relación entre DNasa/ARN debe ser de 5 µl por cada 100 µl de ARN. En nuestro caso, el volumen final fue de 120 µl, de acuerdo a la reacción:

ARN.....	120 µl
Tampon RDD.....	14 µl
DNasa.....	6 µl

Esta mezcla se mantuvo a 28°C durante 2 horas.

12. Para eliminar los restos de DNasa se adicionan 490 µl de RLT con β-mercaptoetanol y 350 µl de etanol 100%. Se mezcla, se pasa a una columna nueva y se centrifuga 30 s.
13. Se transfiere la columna a un nuevo tubo y se adiciona 350 µl de RW1. Se vuelve a centrifugar 30 s.
14. Se añade 500 µl de RPE y se centrifuga 30 segundos. Añadir otros 500 µl y centrifugar 30 s. Eliminar el líquido y volver a centrifugar 2 min.
15. Transferir las columnas a tubos nuevos y añadir a la resina 25 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, dejar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto. Volver a añadir 25 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, dejar a temperatura ambiente 1 min y centrifugar 1 min.

16. Comprobar la calidad y concentración de ARN tras electroforesis en gel de agarosa 1,4% a 100 v durante 15 min.

## **2.17. Experimentos con microarrays**

### ***2.17.1. Crecimiento de las bacterias***

Para el crecimiento de las cepas de *Rhizobium etli* CFN42 se siguió un protocolo modificado descrito en (Girard *et al.*, 2000). Este consiste en:

1. A partir de colonias aisladas crecidas en placas de PY sólido, inocular un tubo con 3 ml de PY. Incubar toda la noche a 30°C en agitación.
2. Inocular matraces de 10 ml de PY haciendo una dilución 1:50. Incubar 10-12 horas a 30°C en agitación.
3. Centrifugar los cultivos por 10 minutos a 7.500 rpm a 4°C y lavar el *pellet* celular con MMY. Inocular matraces de 40 ml de MMY a una densidad óptica de 0.1 (D.O<sub>540 nm</sub>). Incubar 10-12 horas a 30°C en agitación.
4. Eliminar el sobrenadante y congelar el *pellet* celular en nitrógeno líquido.
5. Realizar la extracción del ARN como se describe en el apartado 2.16.

### ***2.17.2 Reversotranscripción del ARN***

Se marcaron 10 µg de ARN de *Rhizobium etli* empleando el kit CyScribe® first strand cDNA labelling kit (HE Healthcare), en un volumen de 10 µl (completar hasta 10 µl con H<sub>2</sub>O libre de RNasas cuando sea necesario).

Incubar el ARN con 1 µl de oligonucleótidos al azar a 70°C por 5 minutos, pasar a hielo y a continuación dejar a 25°C por 10 minutos. Agregar 2 µl de DTT 0.1 M, 4 µl de tampon 5X, 1 µl de una mezcla de dNTPs (donde el dUTP se encuentra en menor cantidad) y 1 µl de dUTP modificado que incorpora un grupo fluorescente Cy3 o Cy5 y 1 µl de la enzima reverso transcriptasa. Cada fluoróforo por separado se utilizó para marcar el ADN complementario (ADNc) perteneciente a las dos condiciones a comparar, en este caso se utilizó el fluoróforo Cy3 para la condición control y Cy5 para la condición de estudio. La reacción se incubó a 42°C por 1,5 horas protegiendo las muestras de la luz.

### **2.17.3 Purificación del ADNc marcado**

Para este paso se empleó el kit CyScribe GFX purification kit (GE Healthcare). Una vez marcados los ADNc con los fluoróforos, agregar 480 µl de tampón de captura previamente calentado a 65°C. Realizar un barrido en un espectrofotómetro desde 300 a 700 nm. Pasar el volumen por una de las columnas del kit y centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm. El eluido se vuelve a escanear en el espectrofotómetro para conocer la incorporación de las cianinas (debe de haber un mínimo de 0.01 unidades de densidad óptica incorporada). Lavar la columna dos veces con 380 µl de tampón de lavado. Volver a centrifugar para eliminar todos los restos de tampón de lavado. Agregar a la columna 40 µl de tampón de elución e incubar 2 minutos a 65°C, centrifugar 1 minuto a 10.000 rpm y volver a eluir con 30 µl de tampón de elución. Secar completamente la muestra en el *speed-vacuum* a una temperatura de 37°C. Resuspender el pellet en 4.5 µl de H<sub>2</sub>O desionizada.

### **2.17.4. Pretratamiento del microarray**

Los *microarrays* de *Rhizobium etli* CFN42 son cristales de 75 x 25 mm con grupos epoxi sobre los cuales se fijaron oligonucleótidos 70-mer representativos de los 6.034 marcos de lectura abiertos (ORFs) del genoma de *Rhizobium etli* CFN42 (González *et al.*, 2003) por duplicado. Dichos *microarrays* fueron impresos en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Salazar *et al.*, 2010).

Antes de la hibridación, la laminilla se prehidrató exponiendo el lado impreso tres veces por 10 segundos al vapor de agua a 60° C. Posteriormente se fijó con tres ciclos de luz UV (0.12 J/cm<sup>2</sup>) e inmediatamente se sumergió la laminilla en agua hirviendo por 2 minutos. Posteriormente la laminilla se incubó en solución de prehibridación (SSC 5X, SDS 0.1% y BSA al 0.1%), en agitación suave por una hora a 42°C. Posteriormente se lavó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente, y se secó por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos.

### **2.17.5. Hibridación del microarray**

Una vez que tenemos las muestras, tanto la control como la problema, marcadas con los distintos fluoróforos y resuspendidas en agua desionizada, se mezclaron las dos muestras teniendo un volumen total de 9 µl y se añadieron 11 µl de tampón de

hibridación (SSC 5X, SDS 0.1% y TE diluido 1/5). Se desnaturalizó toda la mezcla a 94°C por 5 minutos, y a continuación se mantuvo a 65°C, hasta ser aplicada sobre el *microarray*, cubriendo la superficie de éste con un portaobjetos para evitar la formación de burbujas de aire. Incubar a 42°C por 14-18 h en oscuridad.

### ***2.17.6. Procesamiento del microarray tras la hibridación y análisis de datos***

Transcurrido el tiempo de hibridación, la laminilla se lavó una vez con una solución de SSC 1X, SDS 0.05% durante dos minutos a temperatura ambiente, seguida de dos lavados más de 2 minutos cada uno con una solución de SSC 0.06X a temperatura ambiente. La laminilla se secó por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos.

Una vez totalmente seca la laminilla se procedió a la lectura de la misma empleando un escáner (ScanArray Lite, PerkinElmer), el cual consta de dos láseres capaces de excitar a 550 nm y 649 nm para la detección de los fluoróforos Cy3 y Cy5, respectivamente. Para la obtención de las imágenes se utilizó el programa ScanArray Express. Para medir la intensidad de los distintos puntos impresos en la laminilla así como la intensidad del fondo asociado a cada punto, se empleó el software Array-Pro Analyzer 6.5.1. A partir de los datos brutos obtenidos por este programa, se llevó a cabo la sustracción de la señal de fondo, la normalización de los datos y la eliminación de los duplicados usando el programa GenArise, desarrollado por la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Este programa genera una lista de genes diferencialmente expresados, con un valor de *Z-score* asociado a cada gen. Se consideraron como genes diferencialmente expresados aquellos con un valor de *Z-score* mayor de 1.5 y menor a -1,5.

## **2.18. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR)**

### ***2.18.1. Síntesis de ADNc. Reacción de reverso transcripción del ARN***

La síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) a partir de muestras de ARN se realizó siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen).

Se partió de 1 µg de ARN, el cual se mezcló con 1 µl de mezcla de cebadores (100 ng/µl) y 1 µl de dNTPs 10 mM, completando hasta un volumen final de 12 µl con H<sub>2</sub>O libre de RNasa. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y se transfirió

rápidamente a hielo. A continuación se adicionaron 4 µl de tampón First Strand (5X), 2 µl de tampón DTT 0.1M y 1 µl de inhibidor de RNasa. La mezcla se incubó a 25°C durante 2 minutos, después se añadió 1 µl de la enzima reverso transcriptasa (SuperScript II, Invitrogen) y se incubó por 10 minutos a 25°C y posteriormente a 42°C durante 50 minutos para llevar a cabo la reacción de reversotranscripción. Finalmente, la enzima se inactivó por calentamiento a 65°C durante 15 minutos.

### **2.18.2 Reacción de amplificación (qRT-PCR)**

La amplificación de los fragmentos de ADNc para la cuantificación de los niveles de ARNm se realizó en un termociclador iQ de BIORAD y en un volumen final de 25 µl que contenía: DNA, oligonucleótidos específicos para cada gen (0.2 µM) y una mezcla que viene comercialmente preparada 2X iQ SYBR™ Green Supermix® que contiene dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green, fluoresceína y la iQ Taq polimerasa. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 58-60°C 30 segundos y 72°C 30s, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. A continuación un ciclo de 1 minuto a 95°C, otro ciclo de 1 minuto a 70°C seguido de 85 ciclos de 10 segundos en los que la temperatura va incrementando 0.5°C en cada ciclo, partiendo de 55°C hasta alcanzar 97.5°C. Después de cada reacción de PCR cuantitativa se analizó la curva de fusión o de *melting*. Esta curva la proporciona el programa del termociclador y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de temperatura del producto amplificado, pudiendo determinar la formación de productos inespecíficos.

### **2.18.3. Medida de la eficiencia de los oligonucleótidos**

El método que se empleó fue el recomendado por el fabricante del termociclador a través del programa iCycler iQ5 de BioRad que está basado en el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

En nuestro caso la cantidad inicial de DNA es conocida, de forma que realizamos distintas diluciones seriadas con el fin de generar una curva estándar enfrentando el logaritmo de la cantidad inicial de DNA frente el valor Ct obtenido durante la amplificación de cada dilución. De esta manera y a través de una serie de cálculos, se llega a la siguiente fórmula de eficiencia:

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

e = eficiencia de la PCR

a = pendiente de la recta de regresión resultante entre los Ct y la cantidad de DNA en cada dilución.

En condiciones ideales el valor máximo de “e” es 2, de forma que se deduce que la pendiente debería de tener un valor de -3,2, es decir que en cada dilución debería de haber un incremento de 3,2 ciclos.

La eficiencia suele representarse en porcentaje (%), es decir, el porcentaje de DNA amplificado en cada ciclo de reacción. Para convertir la eficiencia (e) en porcentaje utilizamos la siguiente fórmula:

$$\% = (e-1)*100$$

Para obtener resultados robustos nos quedamos con aquellas parejas de oligonucleótidos que mostraron eficiencias en el rango 85-100%. Con el objetivo de contar con oligonucleótidos muy eficientes, se hizo hincapié en un buen diseño de los mismos, procurando que tuvieran un tamaño de 18-20 nucleótidos, una temperatura de fusión (Tm) de 61°C ( $\pm$  1°C), un contenido G+C entre el 50-60% y, sobre todo, que no hubiera interacciones estables entre ambos oligonucleótidos o entre sí mismos que pudieran generar estructuras secundarias. Además, los oligonucleótidos fueron diseñados para que el tamaño de los amplicones estuviese dentro del rango 100-200 pb. Además los amplicones fueron analizados mediante el software DNA folding (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>) en busca de estructuras secundarias estables que impidieran una buena eficiencia en la reacción de amplificación en las condiciones utilizadas.

#### **2.18.4. Cálculo de las expresiones relativas**

El cálculo de la expresión relativa a partir de los datos de la PCR en tiempo real se hizo mediante el método delta-delta ( $\Delta\Delta$ ) de Pfaffl (2001). Después de la reversotranscripción se amplificaron por PCR cuantitativa el gen de estudio y el gen de referencia o constitutivo que en este caso fue el gen para el RNA ribosomal 16S. A partir de los Ct de cada uno, el método consistió en aplicar la siguiente fórmula:

$$ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### **2.19. Extracción y medida de los niveles intracelulares de c-di-GMP**

Se siguió un protocolo previamente descrito por Amikan y colaboradores (Amikam *et al.*, 1995) y por (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).

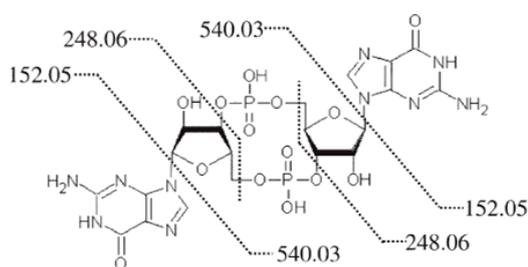
1. A tres cultivos de 10 ml de cada cepa en medio rico incubados hasta alcanzar la fase estacionaria (D.O.<sub>600</sub> de 1), se les añadió formaldehído a una concentración final de 0,19% para el detenimiento del metabolismo celular.
2. Centrifugar 10 min. a 4.000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de agua MQ fría. Centrifugar 3 min. a 13.000 rpm a 4°C.
3. Desechar el sobrenadante y completar con agua MQ fría hasta un volumen final de 0,5ml. Resuspender las células con ayuda de vórtex.
4. Hervir los tubos eppendorf durante 5 minutos.
5. Adicionar etanol 100% frío hasta una concentración final del 65%. Homogeneizar con ayuda de vórtex.
6. Centrifugar 3 min. a 13.000 rpm a 4°C. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Realizar una segunda extracción añadiendo 500 µl de etanol frío al 65%. Homogeneizar con ayuda del vórtex.
7. Centrifugar 3 min. a 13.000 rpm a 4°C. Recoger el sobrenadante.
8. Secar las muestras en el *speed-vacuum* a una temperatura de 50°C hasta que las muestras estén totalmente secas.
9. Resuspender en 300 µl de acetato amónico 10 mM (pH 5,5). Filtrar las muestras con una jeringa de 1 ml acoplada a filtros GHP Acrodisc de un tamaño de poro de 0,45 µm.

Se tomaron 200µl de muestra y se les añadió c-di-GMP puro sintético (Biolog) a una concentración final de 250 nM hasta completar 300 µl de volumen final. Para la cuantificación se realizó una curva estándar con c-di-GMP sintético en un rango de concentraciones entre 2 nM y 20000 nM.

#### ***2.19.1. Análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (MS/MS)***

Todas las muestras de c-di-GMP fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a MS/MS, en el servicio de determinación estructural del Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén. El equipo empleado está compuesto de un cromatógrafo Agilent 1100, acoplado a una columna Waters Spherisorb de 5 µm OSD2 (C-18). El espectrómetro de masas (Esquire

6000, Bruker Daltonics) estaba acoplado con una trampa iónica como analizador (TSQ7000, Finnigan). Para confirmar la identidad del analito, se determinaron tres picos (relación masa/carga,  $m/z$ ) de 540, 248 y 152 por ionización positiva. La relación masa/carga 540 y 152 pertenecen a la fragmentación de enlaces simples y el pico de 248 pertenece a la fragmentación de enlaces dobles (Fig. MM.1). El área del pico de 540 se utilizó para estimar la cantidad de c-di-GMP. Después de sustraer el c-di-GMP basal de 250 nM previamente añadido, las cantidades del segundo mensajero se estandarizaron por mg de proteína total, de una alícuota de 100  $\mu$ l, previamente recogida.



**Figura MM.1. Estructura química del c-di-GMP.** Las líneas de puntos indican la fragmentación iónica de la molécula por dos enlaces ( $m/z = 248$ ) o por enlaces sencillos ( $m/z = 152$  y 540).

## **2.20 Análisis y purificación de proteínas**

### **2.20.1 Metodología para la sobreexpresión de proteínas**

Para la sobreexpresión de posibles proteínas efectoras de *Rhizobium etli* CFN42 en cepas de *E. coli* se empleó el sistema de Qiagen y cuando éste no pudo ser utilizado, como es el caso de la proteína Cella, se utilizó el sistema de Novagen. Ambos sistemas permiten la expresión inducible de genes mediante la adición de IPTG obteniendo grandes cantidades de proteína. Entre los vectores disponibles empleamos el pQE-80L de Quiagen y el pET-28b (+) de Novagen. El primero de ellos es un vector en el cual el gen a expresar se encuentra bajo la influencia del promotor del fago T5 permitiendo marcar las proteínas en el extremo N-terminal con seis histidinas consecutivas (6xHis-tag). Además, este vector contiene un gen *lacI<sup>q</sup>*, obteniendo una fuerte represión del gen en condiciones no inductoras a través de la unión de la proteína LacI<sup>q</sup> a dos secuencias del operador *lac*. En el vector de expresión pET-28b (+), el gen a expresar se encuentra bajo el promotor T7lac, por lo que será necesario introducirlo en una cepa portadora del gen de la ARN polimerasa del fago T7.

Las cepas de *E. coli* empleadas para la sobreexpresión de proteínas han sido OmniMAX 2-T1<sup>R</sup> (Invitrogen) para el sistema de Quiagen y C41 (DE3) y C43 (DE3)

(Miroux & Walker, 1996) para el sistema de Novagen. Las cepas con la construcción correspondiente se inocularon en 4 ml de LB con los correspondientes antibióticos. Al día siguiente se tomaron 500  $\mu$ l de cultivo, se lavó con 1ml de LB fresco y se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ l de LB. De esta resuspensión, se inocularon 200  $\mu$ l en matraces de 10 ml de medio LB adicionado con los correspondientes antibióticos, y se incubaron en agitación a 37°C hasta alcanzar una D.O. entre 0.5-0.7. 1 ml de este cultivo se retiró para el posterior análisis de proteínas en geles SDS-PAGE (t=0). Al resto del cultivo se le añadió IPTG 1 mM y se incubó a 30°C por 3 horas o 24 horas. Transcurrido este tiempo, se tomó de nuevo 1 ml para su comprobación en geles SDS-PAGE (t=3 y t=24). El nivel de expresión fue monitorizado mediante la comparación en geles SDS-PAGE de las muestras a t=0, t=3 y t=24 horas.

Una vez comprobado el nivel de expresión de las proteínas a lo largo del tiempo, se estudió la solubilidad de las mismas bajo las condiciones ensayadas. Para ello se cultivaron las células según la metodología anteriormente descrita. Tras tomar 1 ml de cultivo para t=0, t=3 y t=24, las células se centrifugaron y el pellet bacteriano se resuspendió en 500  $\mu$ l tampón de lisis I. Las células se rompieron por ultrasonidos aplicando 6 ciclos de 15 segundos con un sonicador (Branson Sonifier 250). El lisado se centrifugó a 4°C a 13.000 rpm por 5 minutos, separando así la porción de proteínas solubles (sobrenadante) de los restos celulares y cuerpos de inclusión (pellet). Las porciones correspondientes tanto al sobrenadante como al pellet, fueron analizadas mediante geles SDS-PAGE.

#### *2.20.1.1 Tampones empleados*

- **Tampón de lisis I**

Tris-HCl 50 mM

NaCl 100 mM

DTT 1 mM

Glicerol 5% (p/v)

pH 7.5

#### *2.20.2. Electroforesis de proteínas desnaturizante (SDS-PAGE)*

Para la separación electroforética de proteínas se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% y 15% de 0.75 mm de grosor siguiendo el método descrito por

Laemmli (Laemmli, 1970). Cada gel consta de un segmento superior concentrador y un segmento inferior separador. Las muestras se mezclaron en relación 1:1 con tampón de carga compuesto de Tris-HCl 50 mM, SDS 55 mM, glicerol 4 % (p/v), azul de bromofenol 0,02 % (p/v) y EDTA 1.6 mM, pH=6,8. Éstas fueron hervidas durante 5 minutos a 100° C, antes de ser cargadas en el gel. Para conocer el peso molecular se utilizó el marcador Broad Range (BioRad). Los geles se corrieron en un tampón Tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 1% (p/v) en cubetas de electroforesis vertical Mini-Protean IV (BioRad). La tinción de los mismos se llevó a cabo con una solución que contenía Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 %, metanol 40 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v). Los geles inmersos en esta solución de tinción se calentaron en un microondas durante 10 segundos a máxima potencia para después dejar tiñendo durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se eliminaron los restos de tinción mediante cambios sucesivos con una solución que contenía metanol 20 % (v/v) y ácido acético glacial 10 % (v/v). Los geles fueron escaneados en un escáner HP ScanJet G3010.

2.20.2.1. Soluciones para geles SDS-PAGE

• **Gel separador**

	<b>10%</b>	<b>15%</b>
<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	4.02	3
<b>Tris-HCl 1.5 M pH 8.8</b>	2.08	2.1
<b>SDS 10%</b>	0.085	0.085
<b>Acrilamida 29:1 40%</b>	2.09	3
<b>PSA 10%</b>	0.085	0.085
<b>TEMED</b>	0.008	0.008

Volúmenes expresados en ml para preparar dos geles SDS-PAGE

• **Gel concentrador**

	<b>5%</b>
<b>H<sub>2</sub>O MQ</b>	1.62
<b>Tris-HCl 1 M pH 6.8</b>	0.315
<b>SDS 10%</b>	0.025
<b>Acrilamida 29:1 40%</b>	0.315
<b>PSA 10%</b>	0.025
<b>TEMED</b>	0.003

Volúmenes expresados en ml para preparar dos geles SDS-PAGE

### 2.20.3. Purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas GlnU y Dgt de *R. etli* CFN42 se utilizaron las cepas de *E.coli* OmniMAX 2-T1<sup>R</sup> sobreexpresando dichas proteínas en el vector de expresión pQE-80L.

A partir de un precultivo en fase estacionaria de 10 ml de LB suplementado con el antibiótico Ampicilina (Ap, 200 µg/ml) se inocularon 500 ml de medio LB con Ap (1L para Dgt) y se dejaron crecer a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.5-0.7. Una vez alcanzada dicha D.O., se tomó 1 ml para el posterior análisis de la expresión en geles SDS-PAGE. El cultivo se indujo con 1mM de IPTG y se dejó creciendo a 30°C en agitación por 3 horas para permitir la expresión de las proteínas. Tras las 3 horas se volvió a tomar 1 ml para su análisis en geles SDS-PAGE. Las células se recogieron por centrifugación a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se guardó el *pellet* celular a -80°C para facilitar la rotura de la membrana celular. El *pellet* se resuspendió en 15 ml de tampón de lisis II y se procedió a la lisis celular empleando la prensa francesa a 1.000 psi. El lisado celular se centrifugó a 15.000 rpm a 4°C durante 1 hora, obteniendo la fracción soluble y desechando el *pellet* compuesto fundamentalmente por restos celulares.

El proceso de purificación de las proteínas se realizó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), para lo que se emplearon columnas de Níquel HisTrap<sup>TM</sup> HP de 5 ml (GE Healthcare). El protocolo consistió en pasar los 15 ml de la fracción soluble a través de la columna de Ni previamente equilibrada con el tampón de lavado A, para que la proteína con la marca 6xHis quedara unida a la columna. Para eliminar posibles proteínas contaminantes con afinidad por el Ni se volvió a lavar la columna con 2 volúmenes de tampón de lavado A introduciendo un 5% de tampón B. Por último, se procedió a eluir la proteína introduciendo un gradiente de tampón B, del 5% al 100% en 10 minutos. Las distintas fracciones fueron recogidas en alícuotas de 2 ml y fueron analizadas en geles SDS-PAGE, para determinar en qué fracción la proteína de interés se encontraba en mayor cantidad y pureza.

#### 2.20.3.1 Dialización de proteínas

Para la eliminación del imidazol se utilizaron casetes de diálisis de un tamaño de 3500 MWCO (Slide-A-Lyzer Dualysis, ThermoFischer). La muestra proteica se introdujo en los casetes siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se

eliminó el aire y se introdujo en el tampón de diálisis que fué de 1000 veces el volumen de la muestra. Se hicieron dos tandas de diálisis, la primera de ellas de 4-6 horas y la segunda de 12-14 horas. Finalmente se recogió la muestra con ayuda de una jeringa y se determinó la cantidad de proteínas.

### 2.20.3.2. *Tampones utilizados*

- **Tampón de lisis II**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 10 mM

Una pastilla de inhibidor de proteasas (Roche)

pH = 8

- **Tampón de lavado A**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 20 mM

pH = 8

- **Tampón B**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM

NaCl 300 mM

Imidazol 500 mM

pH= 8

- **Tampón de diálisis**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM

NaCl 300 mM

pH = 8

### **2.21. Determinación de proteínas totales**

La cuantificación de proteínas fue llevada a cabo mediante el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se preparó una recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en el mismo tampón en el que se encontraba la muestra problema. Sobre cada cubeta con patrón o muestra se añadieron 800 µl del reactivo BioRad protein assay (BioRad) diluido 1:5 en agua, y TE hasta completar un volumen

total de 1 ml. Se agitaron las cubetas y tras 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 1800.

### **2.22. Purificación del MLG**

Para la purificación del  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) de Sme y Ret, se crecieron precultivos de 10 ml en MM durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó y lavó el pellet celular varias veces con MM para resuspenderlo en 1 ml de MM e inocular matraces de 500 ml con 500  $\mu$ l de la resuspensión bacteriana. A continuación, el cultivo se dejó crecer a 28°C durante tres días con una velocidad de agitación moderada (80 rpm). Tras el crecimiento, el cultivo se filtró por un cedazo de 0.5 mm de tamaño de poro para retener los floculos. A continuación, el cedazo se sumergió en agua destilada tres veces para lavar los flóculos de MLG. Con ayuda de una pipeta, se recogieron los flóculos para introducirlos en un recipiente de vidrio con 30 ml de agua MQ para posteriormente hervir las muestras durante 5 minutos. Seguidamente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el pellet se volvió a resuspender en 30 ml de agua MQ. Se repitió todo el proceso de hervir y lavar las muestras 4 veces más. Finalmente, el pellet obtenido se congeló a -80 °C y se procedió a su liofilización hasta su completa deshidratación.

Cinco miligramos del MLG fueron digeridos con 10 unidades de liquenasa (endo-1,3 (4)- $\beta$ -glucanasa, Megazyme) en 1 ml de agua durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras la digestión, las muestras fueron centrifugadas a 16.000 rpm por 10 minutos. A continuación los sobrenadantes fueron congelados a -80 °C, liofilizados y disueltos en agua. Para el análisis de los productos obtenidos tras la digestión, las muestras se analizaron en una placa de cromatografía en capa fina (TLC) de silica gel (Alugram Sil G/UV, Macherey-Nagel) usando butanol:ácido acético:agua (2:1:1) como eluyente. Una mezcla de diferentes oligosacáridos se utilizó como marcador.

## **III. TÉCNICAS ANALÍTICAS**

### **3.1 Cromatografía en capa fina (TLC)**

Para poner de manifiesto la producción de factores de nodulación (factores Nod) en *R. etli* CFN42 se siguió un protocolo modificado previamente descrito por Cárdenas y colaboradores (Cárdenas *et al.*, 1995). A partir de precultivos en medio PY, se

inocularon matraces de 10 ml de MMY suplementado con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , ajustando la  $\text{DO}_{600}$  a 0,1. Los cultivos se indujeron con el flavonoide naringenina (preparado en etanol 100%) quedando a una concentración final de 1.5  $\mu\text{M}$ . Como control se colocaron cultivos sin naringenina. A continuación, se tomó 1 ml del cultivo y se colocó en tubos de plástico estériles especiales para radiactividad, al que se le añadió 0.25  $\mu\text{Ci}$  de L-[metil  $^{14}\text{C}$ ]- metionina (56.3 mCi/mmol, Perkin Elmer) o 0.5  $\mu\text{Ci}$  de D-[1- $^{14}\text{C}$ ]-glucosamina (54 mCi/mmol, Amersham). Los matraces y los tubos con la marca radiactiva fueron incubados a 30°C durante 30 horas hasta alcanzar una fase estacionaria ( $\text{DO}_{600}$  0.8-1). La extracción de los factores Nods se realizó mediante la adición de 0.5 ml de 1-butanol saturado con agua. Tras realizar varias agitaciones con vórtex, posteriormente se procedió a evaporar el butanol en el speed-vacuum, para resuspender los factores Nod en 20  $\mu\text{l}$  de 1-butanol saturado con agua. 6  $\mu\text{l}$  de esta solución se colocaron sobre una placa de sílica octadecilo (C18, Sigma), para su análisis. Tras correr las muestras durante 20 minutos en una fase móvil compuesta por acetonitrilo:agua (1:1), la placa se dejó secar antes de proceder a su revelado en una película radiográfica (GE Healthcare) durante 4-5 días. La posterior visualización de los compuestos radiactivos se hizo en un equipo PhosphorImager (Molecular Dynamics Amersham) equipado con el software Storm 820.

### **3.2 Cromatografía para la identificación de nuevas proteínas efectoras capaces de unir c-di-GMP**

Para la obtención de lisados de *R. etli* CFN42 enriquecidos en posibles proteínas efectoras que unan c-di-GMP se siguió el protocolo descrito previamente en el trabajo desarrollado por Düvel y colaboradores (Düvel *et al.*, 2012).

Se partió de dos litros de cultivo de *R. etli* CFN42 crecido en medio TY hasta fase exponencial tardía ( $\text{DO}_{600}$  0.8-0.9). Tras centrifugar por 15 minutos a 6500 rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante, el pellet celular se lavó con tampón fosfato (PBS). A continuación las células fueron resuspendidas en 12 ml de tampón fosfato, el cual contenía 1mM dithiothreitol (DTT), una pastilla de inhibidor de proteasas (Roche), benzonasa (Novagen), 10 mM ATP, 1mM GTP, 0.25 mM cAMP y 0.25 mM cGMP. Las células se lisaron mediante dos pases por la prensa de French (1000 PSI). El lisado se volvió a centrifugar a 16500 rpm a 4°C por 45 minutos, para eliminar los restos celulares.

Se equilibraron sendas alícuotas de 200  $\mu$ l de sefarosa, una con el c-di-GMP unido (BioLog, Cat. N<sup>o</sup>. C 057) y otra control sin c-di-GMP (GE Healthcare, Cat. N<sup>o</sup> 17-0906-01), lavando tres veces con 10 ml de tampón PBS en tubos de 15 ml. El lisado obtenido se mezcló con la sefarosa y se incubó por 2 horas a 4°C en un agitador orbital. A continuación se centrifugó la sefarosa para ambas condiciones, a 1500 rpm por 1 minuto a 4°C para posteriormente, lavarla cinco veces con 10 ml de PBS tomando alícuotas en cada lavado para su posterior análisis en geles SDS-PAGE. La sefarosa se traspasó a tubos eppendorf de 1.5 ml para volver a lavarla con 1 ml de PBS. Se tomó una alícuota del sobrenadante para su análisis en geles SDS-PAGE y el resto se eliminó. Finalmente las proteínas unidas a la sefarosa se eluyeron con 250  $\mu$ l de c-di-GMP 100  $\mu$ M durante 40 minutos a 4°C en un agitador orbital. Transcurrido este tiempo se volvió a centrifugar la sefarosa por 1 minuto a 4°C y se recogió el sobrenadante de ambas condiciones (sefarosa con y sin 2'-AHC-c-di-GMP), para la posterior identificación de las proteínas unidas a la sefarosa mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS).

- **Tampón fosfato (PBS) 1X**

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM

pH 7.4

### **3.2.1 Dot blot**

Para comprobar el enriquecimiento de proteínas efectoras obtenidas por cromatografía de afinidad, se llevaron a cabo ensayos *dot blot* con un análogo fluorescente del c-di-GMP. El análogo empleado fue 2'-O-(6-[Fluorescenil]-aminohexilcarbamoil)-c-di-GMP o 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP (Biolog), el cual posee un espectro de excitación/emisión de 494/517 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ).

Previo a cada ensayo de *dot blot*, todas las muestras proteicas fueron ajustadas a la misma concentración de proteína, 1 mg/ml. Un total de 3  $\mu$ g de proteína se colocaron sobre un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m (Immobilon, Millipore). Las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente y las membranas se bloquearon con TBS-T conteniendo 5% de leche desnatada en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las membranas con 2'-Fluo-AHC-

c-di-GMP 1 $\mu$ M disuelto en la solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas con TBS-T durante 10 minutos, estas fueron reveladas en un Phosfoimager FX (BioRad), empleando los parámetros para el SYBR Green I. Como control positivo, se empleó la proteína con dominio PilZ PA3353 de *Pseudomonas aeruginosa* (Düvel *et al.*, 2012). Como control negativo para los *dot blot* con proteína purificada, se empleó la albumina de suero bovino (BSA) y como control negativo de lisados se utilizó lisado de la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido pQE-80L. Además, se ensayó el tampón en el cual estaba resuspendida cada muestra para descartar alguna posible señal fluorescente por parte de este.

### **3.3. Fluorescencia polarizada (FP)**

Un ensayo de fluorescencia polarizada (FP) permite ver de forma rápida, sencilla y con bajo consumo de muestra, interacciones biomoleculares (interacciones proteína-proteína, proteína-ácidos nucleicos y proteína-ligando) (Moll *et al.*, 2006b). En este trabajo se ha usado esta técnica para ver la interacción de las proteínas Dgt y GlmU de *Rhizobium etli* CFN42.

Un ensayo de FP se basa en el empleo de un ligando pequeño marcado con un fluoróforo, el cual puede absorber energía lumínica a una determinada longitud de onda ( $\lambda$ ) para después liberarla a una  $\lambda$  mayor (menos energética). Al excitar una solución acuosa con luz polarizada, las moléculas marcadas giran sobre sí mismas emitiendo luz en distintos planos al plano de excitación, por lo que no se obtiene luz polarizada. Pero cuando el ligando marcado se une a una molécula de mayor peso molecular (en este caso una proteína), este disminuye la velocidad de rotación y la luz se emite en el mismo plano que el de excitación, dando lugar a luz polarizada.

Se han usado dos modalidades de este ensayo: ensayo directo y ensayo competitivo. En ambos casos, las medidas se han tomado a temperatura ambiente en un lector de placas CLARIOstar® (BMG Labtech) empleando placas negras de 384 pocillos (OptiPlate, Perkin Elmer), con una pareja de filtros de excitación/emisión de 485/535 nm. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6.0, representando la fluorescencia polarizada frente al logaritmo de la concentración de la proteína obteniendo una curva sigmoidea donde se puede determinar la constante de disociación ( $K_D$ ).

### **3.3.1. Ensayo directo**

En este ensayo se realizaron diferentes diluciones de las proteínas en tampón FP, desde 65  $\mu\text{M}$  hasta 65 nM para GlmU, y desde 1.8  $\mu\text{M}$  hasta 0.18 nM para Dgt. Como análogo fluorescente al c-di-GMP se empleó el 2'-O-(6-[Fluoresceinil]-aminohexilcarbamoil)-diguanosina monofosfato cíclico o 2'-Fluo-AHC-c-diGMP (Biolog), a una concentración final de 5 nM. En cada pocillo se cargaron un total de 60  $\mu\text{l}$  realizando tres réplicas técnicas para cada dilución de la proteína. Como control se cargaron 3 réplicas con 60  $\mu\text{l}$  de tampón FP y para el ajuste de la cantidad mínima de fluorescencia se cargó un pocillo con 60  $\mu\text{l}$  del fluoróforo disuelto en tampón FP a concentración final de 5 nM.

### **3.3.2. Ensayo competitivo**

En este tipo de ensayo se pretendía ver si el c-di-GMP sin marcar era capaz de desplazar al análogo fluorescente. Para ello, concentraciones crecientes de c-di-GMP (0, 50 y 500  $\mu\text{M}$ ) sin marcar fueron incubados con 10  $\mu\text{M}$  de la proteína GlmU durante 30 minutos a 4°C para a continuación añadir el análogo fluorescente a una concentración final de 5 nM en un volumen total de 60  $\mu\text{l}$ . La fluorescencia polarizada fue medida tras un minuto.

- **Tampón FP**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM

NaCl 300 mM

CHAPS 0.005% (v:v) como surfactante.

### **3.4 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)**

Para analizar la interacción entre la proteína GlmU y el segundo mensajero c-di-GMP se empleó un protocolo modificado de (Moll *et al.*, 2006a), se utilizó un microcalorímetro (MicroCall LLC). Como agente diluyente tanto de la proteína GlmU como del c-di-GMP se utilizó el tampón fosfato empleado en la diálisis de la proteína (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 300 mM, pH 8). 7  $\mu\text{l}$  de c-di-GMP a una concentración de 170  $\mu\text{M}$  fueron inyectándose en una celda que contenía la proteína GlmU a 20  $\mu\text{M}$  a una temperatura de 20 °C y con una agitación de 307 rpm. Como

control se realizaron inyecciones solo del tampón. Los datos fueron analizados con el software MicroCal Origin.

#### **IV. ENSAYOS CON PLANTAS.**

##### **4.1. Esterilización y germinación de semillas**

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* cultivar Aragón) se esterilizaron sumergiendo las semillas en HgCl<sub>2</sub> al 2,5% durante 9 minutos. A continuación se lavaron 5-6 veces con abundante agua desionizada estéril y se dejaron en imbibición durante dos horas en agitación. Transcurrido este tiempo se volvieron a lavar con agua desionizada estéril hasta que el agua volvió a quedar transparente. Se colocaron las semillas bien separadas en placas Petri estériles que contenían papel de filtro adicionado con 3 ml de agua destilada estéril. Por último, se dejaron las semillas germinando en oscuridad a 28°C durante 48 horas.

Las semillas de veza (*Vicia sativa* cultivar José) fueron esterilizadas en superficie por inmersión en etanol 100% durante 2 minutos. Después se lavaron 5-6 veces con agua estéril para volverlas a sumergir en una solución de hipoclorito sódico al 5% durante 7 minutos. Se volvieron a realizar 7-8 lavados con agua estéril y finalmente se colocaron en imbibición durante 10-12 horas. Transcurrido este tiempo se lavaron de nuevo con agua estéril, se colocaron en condiciones asépticas en placas Petri sobre papel de filtro humedecido colocado y se dejaron en oscuridad a 28°C durante 48 horas.

Las semillas de judía (*Phaseolus vulgaris* cultivares Contender y Negro Jamapa) fueron esterilizadas en superficie mediante inmersión en etanol 100% durante 5 minutos dos veces y posteriormente lavadas 2-3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de etanol. A continuación las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito sódico al 5% durante 5 minutos para volver a lavarlas 7 veces con agua estéril. Finalmente se seleccionaron aquellas semillas que presentaban la cutícula sin alterar y se dejaron germinar en placas que contienen agua:agar (1%) en oscuridad a 28°C durante tres días.

##### **4.2 Solución nutritiva**

Para los cultivos hidropónicos se ha utilizado la solución nutritiva libre de nitrógeno de (Rigaud & Puppo, 1975) modificada:

➤	Macroelementos:	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	68 mg/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	44 mg/l
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	123 mg/l
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	174 mg/l
	CaSO <sub>4</sub> .....	120 mg/l
	EDTA férrico .....	25 mg/l
➤	Microelementos	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,11 mg/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,85 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	3,07 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,55 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,2 mg/l

El pH de la solución se ajustó a 7,5 con KOH. La solución se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

#### **4.3. Medida de la eficiencia simbiótica**

El cultivo de alfalfa, veza y judía se llevó a cabo en sistemas hidropónicos en dispositivos del tipo jarra Leonard (Leonard, 1943), conteniendo una mezcla de vermiculita:perlita (3:1) como sustrato y la solución nutritiva libre de nitrógeno en la parte basal. Para cada cepa se inocularon 25 plántulas de veza y alfalfa y 12 de judía con 10<sup>6</sup> UFC/raíz del inoculo correspondiente (*R. etli* para judía, *S. meliloti* para alfalfa y *R. leguminosarum* para veza). Cubrimos las semillas con la vermiculita y cubrimos la parte basal con papel para mantener las raíces en oscuridad. Las plántulas de alfalfa y judía fueron cultivadas en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y una temperatura de 24/16°C día/noche y un 75% de humedad relativa. Las plantas de veza fueron cultivadas en un invernadero.

El peso fresco de la parte aérea, el peso seco de la parte aérea, el número de nódulos por planta, el peso por nódulo y el contenido en nitrógeno fueron determinados después de 29 días de crecimiento para las judías y 41 días para veza y alfalfa. El peso seco de la parte aérea fue obtenido tras incubar la biomasa en una estufa a 65°C por 3

días. A continuación, el material seco fue triturado para determinar el contenido de nitrógeno total a través del servicio de Ionómica del Instituto CEBAS-CSIC (Murcia).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, realizando un análisis de la varianza (ANOVA) empleando el software IBM SPSS statistic 22.

### **4.4. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7 *in planta***

Con el fin de determinar la estabilidad de las construcciones mini-Tn7 y los vectores pJB3Tc19 y pJBpleD\* *in planta*, se tomaron 50 nódulos de cada cepa y se esterilizaron en superficie por inmersión en una solución de HgCl<sub>2</sub> 0.25% durante 5 minutos. Tras 5 lavados con abundante agua estéril, los nódulos se machacaron con ayuda de una varilla de vidrio y el contenido de cada uno se sembró en placas de medio TY sólido, con o sin los antibióticos correspondientes.

### **4.5. Adhesión a raíces**

Las semillas de veza, judía y alfalfa fueron esterilizadas y germinadas como se describe en el apartado 4.1. Una vez germinadas, 9 plántulas fueron transferidas a un matraz que contenía 50 ml para judía y veza o 25 ml para alfalfa de una suspensión bacteriana con  $5 \times 10^6$  UFC/ml de las distintas cepas a competir. Tras incubar las plántulas con la suspensión bacteriana por 4 horas, las raíces fueron separadas del tallo y se hicieron grupos de 3 raíces. Estas fueron lavadas 4 veces con 10 ml de agua estéril en tubos falcon o eppendorf (para alfalfa), para eliminar todas las bacterias no unidas a la raíz. A continuación, 10 ml de medio MM adicionado con EDTA 2mM se añadieron a las raíces para liberar las bacterias adheridas mediante dos ciclos de un minuto de vórtex y 1 minuto en un baño de sonicación. Diluciones seriadas fueron sembradas en placas de MM suplementado con CR, distinguiéndose las bacterias portadoras de *pleD\** (colonias rojas) de las cepas control (colonias blancas). Se determinó el porcentaje de células adheridas por gramo de raíz con respecto al total de bacterias inoculadas.

En el caso de los mutantes de Ret (capítulo 2), se procedió a la modificación de este protocolo. Una vez las semillas fueron germinadas, como se explica en el apartado 4.1, las plántulas se colocaron en vasitos de orina de 50 ml a los que previamente se les había hecho tres agujeros en la tapa para poder introducir la raíz de las plántulas, de forma que la raíz quedaba inmersa en la solución nutritiva y el cotiledón permanecía en la superficie de la tapa. Se incubaron las plántulas durante 48 horas en oscuridad. A

continuación, tomando solo la tapa, se traspararon las plántulas a otro vasito de orina que contenía 50 ml de la mezcla bacteriana preparada en solución nutritiva. Se mantuvieron los vasitos en agitación suave (120 rpm) durante 12, 24 o 48 horas para posteriormente procesar las raíces como se ha explicado anteriormente. Para poder diferenciar las dos cepas en competencia, cuando fue posible las diluciones seriadas se sembraron en placas de medio MM adicionado con CR. Cuando la selección con CR no fue posible, las cepas a competir fueron seleccionadas por portar diferentes resistencias a antibióticos. Finalmente se determinó el porcentaje de cada cepa adherida a la raíz.

## **V. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS**

### **5.1. Microscopia óptica para la observación de bacteroides**

La observación de los bacteroides se realizó siguiendo un protocolo descrito por Haynes y colaboradores (Haynes *et al.*, 2004). Los bacteroides fueron liberados del interior del nódulo mediante un corte transversal de éste sobre un portaobjetos. Tras colocar la cara cortada del nódulo hacia el cristal, los bacteroides adheridos al cristal fueron teñidos con una solución de SYTO 13, el cual estaba preparado en tampón PIPES 80 mM a una concentración de 1µl/ml de tampón. Los bacteroides se dejaron teñiendo en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos, para su posterior visualización al microscopio óptico de fluorescencia Zeiss Axioskope empleando el objetivo de 100 aumentos (100x)

### **5.2. Microscopia óptica para la observación de nódulos de judía**

Se siguió un protocolo modificado descrito por Redondo y colaboradores (Redondo *et al.*, 2009). Los nódulos fueron recolectados de plantas de judía variedad Negro Jamapa 29 días post-inoculación. Se tomaron 8 nódulos provenientes de 4 plantas distintas de dos zonas distintas de la raíz: i) zona A, se corresponde con la base del tallo y corona de la raíz, son los nódulos que primero se forman y por tanto suelen ser de mayor tamaño y más desarrollados, ii) zona I, se corresponde con una zona intermedia de la raíz, aquí los nódulos suelen ser de menor tamaño y son de formación más reciente.

Tras su recolección, los nódulos fueron inmediatamente fijados en una mezcla de glutaraldehído 5% y paraformaldehído 4% en tampón cacodilato sódico 100 mM conteniendo 25 mg/ml de sacarosa (pH 7.4). La fijación se hizo en vacío por dos horas

## Materiales y métodos

---

manteniendo siempre las muestras en frío. Transcurrido este tiempo, se realizó un segundo proceso de fijación durante 16h a 4°C en agitación. Al día siguiente se hicieron 3 lavados de una hora con tampón cacodilato a 4°C en agitación. Las muestras fueron post-fijadas en 1% tetróxido de osmio en tampón cacodilato, durante 16 h a 4°C. La deshidratación de las muestras se hizo mediante inmersión de 1 hora en concentraciones crecientes de etanol. Finalmente, las muestras fueron incubadas con acetato de uranilo 1% en etanol 70% durante 24 h a 4°C.

Los nódulos fijados fueron embebidos en resina acrílica (Unicryl) tras un proceso de polimerización a 60°C. Cortes semifinos (1µm) se realizaron con un micrótomo equipado con cuchilla de diamante. Dichos cortes semifinos fueron teñidos con 1% de azul de toluidina para su observación directa en un microscopio óptico Zeiss Axioskope. Se tomaron fotografías de los nódulos completos y de las regiones de interés con diferentes aumentos (4x, 10x, 40x y 100x).



## **CAPÍTULO I**



---

## **1. Impacto de elevados niveles del segundo mensajero c-di-GMP en bacterias que interaccionan con plantas**

### **1.1. Uso de la construcción pJBpleD\* para incrementar los niveles intracelulares de c-di-GMP en bacterias.**

Gracias a las herramientas bioinformáticas, cada día se dispone de más datos acerca de las proteínas codificadas en los genomas bacterianos. En el caso de las bacterias que interaccionan con plantas, el número de proteínas implicadas en el metabolismo, síntesis o degradación del segundo mensajero c-di-GMP es elevado. Este alto número de proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP sugiere multiplicidad y redundancia funcional, lo cual limita las posibilidades de estudio de cada una de ellas mediante abordajes genéticos clásicos. Por este motivo, se ha seguido una estrategia experimental alternativa, basada en el incremento artificial de los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP y el estudio de su impacto sobre distintos aspectos del ciclo de vida bacteriano.

Como se ha mencionado en la introducción, la diguanilato ciclasa (DGC) PleD es un regulador de respuesta que controla la diferenciación celular durante la división asimétrica característica de la bacteria *Caulobacter crescentus* (Aldridge *et al.*, 2003; Levi & Jenal, 2006; Paul *et al.*, 2004). PleD presenta actividad diguanilato ciclasa asociada al sitio activo A, donde se localiza un motivo GGEEF, y está regulada alostéricamente por c-di-GMP a través de un sitio I (inhibitorio) funcional. Además, esta proteína contiene dos dominios receptores de grupos fosfato conocidos como REC1 y REC2, aunque solo el primero de ellos parece estar implicado en la regulación de la actividad DGC, a través del residuo Asp-53 que es susceptible de fosforilación por la quinasa DivJ. Dicha fosforilación desencadena una serie de cambios conformacionales que culminan con la formación de dímeros enzimáticamente activos (Paul *et al.*, 2007; Wassmann *et al.*, 2007).

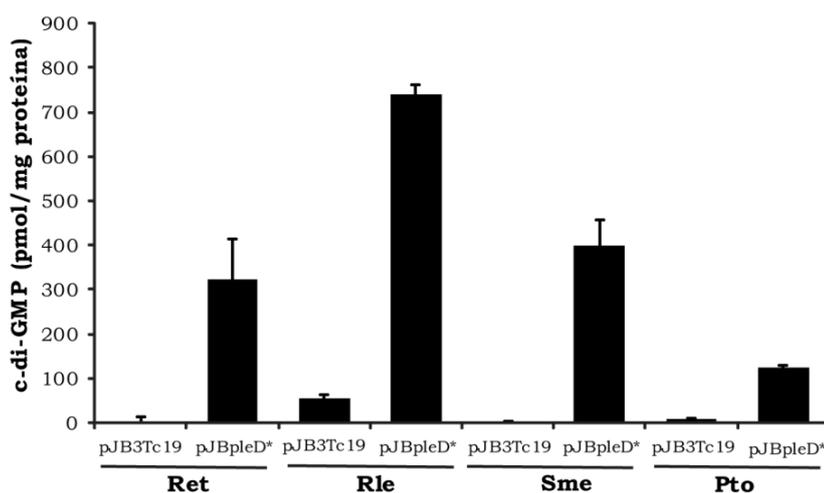
La DGC utilizada en este trabajo se conoce como PleD\* (Aldridge *et al.*, 2003), una derivada de PleD que posee cuatro mutaciones puntuales que hacen que la actividad DGC sea independiente de su estado de fosforilación y por tanto muestre actividad DGC constitutiva. Es importante destacar que, a pesar de que la actividad de PleD\* no

dependa de su estado de fosforilación, ésta sigue manteniendo la regulación alostérica por producto.

**1.1.1. Aumento artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP y su cuantificación.**

Para estudiar el efecto de elevados niveles de c-di-GMP en diferentes bacterias que interaccionan con plantas, tanto en vida libre como durante su interacción con el hospedador, se utilizó el plásmido pJBpleD\* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014), que contiene el gen *pleD\** bajo el control transcripcional del promotor *lac*, clonado en el vector pJB3Tc19. Dicho plásmido se introdujo mediante conjugación biparental en las siguientes cepas: *Rhizobium etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle), *Sinorhizobium meliloti* 8530 (Sme) y en el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto).

Para comprobar si la sobreexpresión de *pleD\** desde el vector pJBpleD\* aumentaba de forma significativa los niveles intracelulares de c-di-GMP en estas bacterias, se cuantificó este segundo mensajero mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas (ver apartado 2.19 de la sección Materiales y Métodos). Las cantidades de c-di-GMP en las cepas con el vector pJBpleD\* fueron comparadas con las de las cepas control, portadoras del vector pJB3Tc19 vacío.



**Figura 1.1. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP.** Cantidad de c-di-GMP en *R. etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle), *S. meliloti* 8530 (Sme) y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 expresando *pleD\** en multicopia (pJBpleD\*) y sus respectivas cepas control con el vector vacío (pJB3Tc19). Cada valor representa la media de 3 réplicas biológicas. Las barras indican el error estándar.

En la figura 1.1 se recogen los valores obtenidos tras la cuantificación de c-di-GMP de las distintas cepas bacterianas, crecidas en medio rico TY a una  $DO_{600}$  de aproximadamente 1. Los niveles fisiológicos de c-di-GMP de las distintas cepas portando el vector vacío se encontraron cerca o por debajo del límite de detección de la técnica (Fig. 1.1). Sin embargo, en todas las especies analizadas, la sobreexpresión de la DGC *PleD\** provocó importantes incrementos de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Por ejemplo, en *Rle* y *Pto*, la expresión de *pleD\** multiplicó los niveles de c-di-GMP por 13 y 17, respectivamente. En *Ret* y *Sme* el rango de aumento no pudo determinarse porque las cantidades de c-di-GMP de las cepas control (niveles fisiológicos normales) estuvieron siempre por debajo del límite de detección de la técnica.

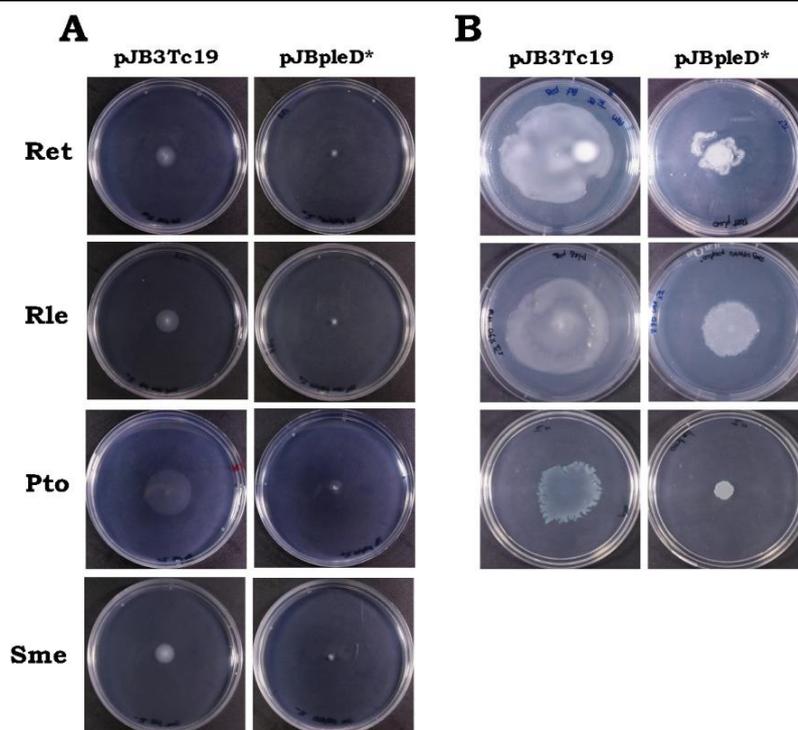
### ***1.1.2. Impacto de elevados niveles de c-di-GMP en bacterias en vida libre***

Se determinó si la expresión del gen *pleD\** y los elevados niveles de c-di-GMP podrían afectar al crecimiento bacteriano. Debido a la formación de flóculos inducidos por altos niveles de c-di-GMP, se realizaron curvas de crecimiento con cepas de *Pto* y *Ret* delecionadas en el operón de la celulosa portando las construcciones *pJB3Tc19* y *pJBpleD\**. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las cepas de *Pto* y *Ret* portando el plásmido *pJBpleD\** y el control *pJB3Tc19*.

El c-di-GMP es un segundo mensajero implicado, fundamentalmente, en la regulación de la transición entre los estilos de vida móvil y sedentario o sésil. Es por ello que el estudio de los cambios fenotípicos asociados a altos niveles de c-di-GMP se centró en procesos bacterianos clave en esta transición, tales como la motilidad bacteriana, la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelículas.

#### ***1.1.2.1. Motilidad bacteriana***

Para comprobar el efecto de elevados niveles intracelulares de c-di-GMP en la motilidad de nuestras bacterias modelo, se llevaron a cabo ensayos de motilidad dependiente de flagelos, *swimming* y *swarming*.



**Figura 1.2. Impacto de altos niveles de c-di-GMP sobre la motilidad bacteriana.** A). Motilidad tipo *swimming* de las bacterias indicadas portando los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD\*. El halo de motilidad se midió tras 3 días de incubación a 28°C para los rizobios y 24 horas para *Pseudomonas*, en placas de medio Bromfield semisólido (0.3% agar). B) Motilidad en superficie o tipo *swarming* sobre placas de medio mínimo (0.6% agar) incubadas durante 3 días a 28°C para los rizobios y 24 horas para *Pseudomonas*. *R. etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle), *S. meliloti* 8530 (Sme) y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pto).

En las cuatro especies estudiadas, ambos tipos de motilidad, *swimming* (Fig. 1.2A) y *swarming* (Fig. 1.2B), se vieron drásticamente reducidas en presencia de altos niveles de c-di-GMP. En el caso de Sme, la gran producción de EPSs, no permitió realizar ensayos adecuados de motilidad *swarming*. En esta bacteria, la producción de EPS favorece un tipo de motilidad pasiva, independiente de flagelos denominada *sliding*, que a menudo se confunde con la motilidad *swarming* (Nogales *et al.*, 2012).

#### 1.1.2.2. Producción de exopolisacáridos (EPSs)

La producción de EPSs por bacterias es un proceso regulado por múltiples condiciones medioambientales. El papel de estos EPSs puede ser muy variado, como la protección frente a estreses bióticos y abióticos, así como el integrar la matriz extracelular implicada en la adhesión a superficies, la formación de biopelículas o las interacciones con otros organismos (Whitney & Howell, 2012).

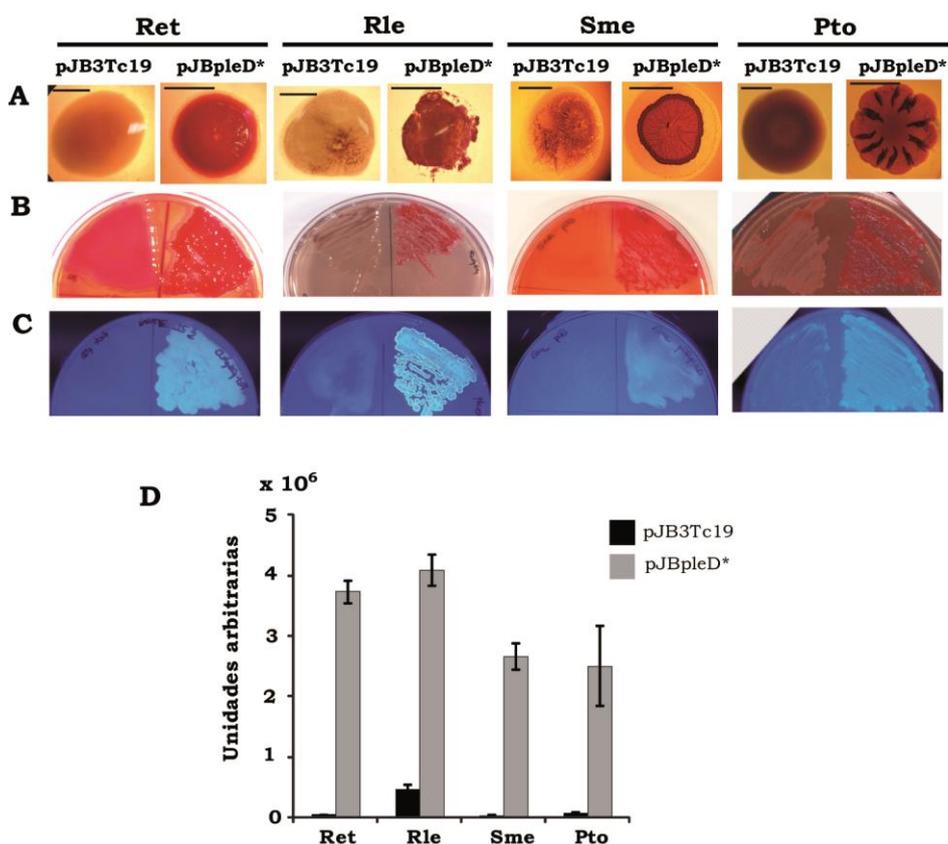
La producción de EPSs suele ponerse de manifiesto mediante el crecimiento de las bacterias en medio adicionado de colorantes. Entre los más extendidos están el rojo Congo (CR) y el calcoflúor (CF). El CR une unidades D-glucopiranosil de polisacáridos neutros o básicos, así como algunas proteínas, mientras que el CF es más específico y se une a enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4) y  $\beta$  (1-3), como los de la celulosa y el curdlan, respectivamente (Spiers *et al.*, 2002; Teather & Wood, 1982).

Para estudiar el impacto de este segundo mensajero en la producción de EPSs, las cuatro especies de estudio expresando *pleD\** y sus respectivas cepas control portando el vector vacío pJB3Tc19, se crecieron sobre medio sólido adicionado de CR o CF. En todos los casos, los altos niveles de c-di-GMP provocaron la formación de colonias rugosas y de color rojo intenso en medios con CR, que contrastaban con las bacterias control, mucosas y de color blanquecino o ligeramente rosado (Fig. 1.3 A y B). De forma análoga, sobre medio sólido adicionado con calcoflúor, las bacterias que expresaban *pleD\**, presentaban una fluorescencia brillante y de color azulada bajo luz ultravioleta, en comparación con las cepas control (Fig. 1.3 C). La propiedad de unión a CF fue aprovechada para cuantificar la producción de EPSs. Para ello, las bacterias se crecieron en medio mínimo líquido adicionado con CF y posteriormente se midió la fluorescencia emitida, la cual es directamente proporcional a la cantidad de EPS presente en el medio. La figura 1.3 D, muestra la fluorescencia emitida por los cultivos bacterianos de las cuatro cepas de estudio con y sin *PleD\**. En todos los casos, altos niveles de c-di-GMP provocaron un aumento significativo de la fluorescencia, probablemente debida a la mayor producción de EPSs. Los casos más destacados lo encontramos en *Ret* y *Sme*, donde la sobreexpresión de *PleD\** provocó un aumento de la fluorescencia de más de 70 veces en comparación con sus respectivas cepas control, portadoras del vector vacío.

En la cepa *Pto* los fenotipos observados en medios con CR y CF fueron debidos a la producción del polisacárido celulosa, ya que un mutante en los genes *wssBC* del operón de la celulosa, pierde la capacidad de unir CR y CF, aun cuando los niveles de c-di-GMP son elevados (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Prada-Ramírez *et al.*, 2015). *Sme*, al contrario que la mayoría de rizobios, carece del operón de biosíntesis de celulosa y los fenotipos CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup> dependientes de la presencia de elevados niveles intracelulares de c-di-GMP son debidos a la producción de un nuevo exopolisacárido, conocido como  $\beta$ -

## Capítulo I

glucano de enlaces mixtos (MLG) (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Tanto Ret como Rle, presentan los genes necesarios para la síntesis de ambos polisacáridos, celulosa y MLG, por lo que los fenotipos observados en CR y CF, dependientes de c-di-GMP, son probablemente debidos a incrementos de la producción de ambos polisacáridos (ver Capítulo II).

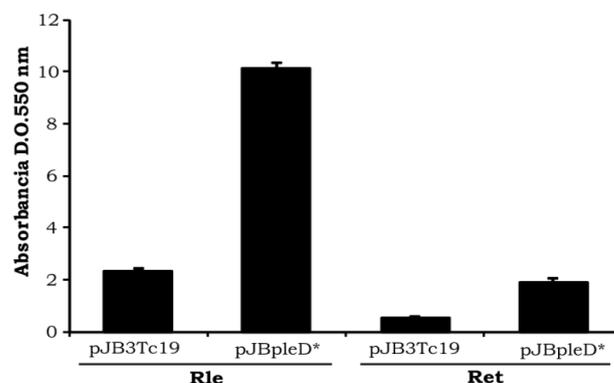


**Figura 1.3.** Efecto de elevados niveles de c-di-GMP en la producción de exopolisacáridos. A) Morfología de colonias aisladas y B) crecimiento en masa sobre medio sólido adicionado de rojo Congo (CR, 125  $\mu\text{g/ml}$ ) o C) calcoflúor (CF, 200  $\mu\text{g/ml}$ ), de bacterias portadoras del plásmido pJBpleD\* o el vector vacío pJB3Tc19. Las fotos se tomaron tras 48 horas de crecimiento a 28°C para los rizobios y a 20°C para Pto. D) Fluorescencia emitida bajo luz UV por cultivos líquidos en medio con calcoflúor (100  $\mu\text{g/ml}$ ). *R. etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. viciae UPM791 (Rle), *S. meliloti* 8530 (Sme) y *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Pto). Las barras indican la media de tres replicas técnicas  $\pm$  desviación estándar.

### 1.1.2.3. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas se puede cuantificar mediante tinción con el colorante cristal violeta (CV) (O'Toole *et al.*, 1999). Para analizar el efecto de elevados niveles de c-di-GMP en la formación de biopelículas, nuestras bacterias modelo fueron cultivadas en MM en placas multipocillo de poliestireno, durante 72 h en agitación. En

Ret y Rle la presencia de PleD\* dio lugar a un significativo incremento en la formación de biopelículas, siendo más desarrolladas y compactas que las formadas en condiciones fisiológicas de c-di-GMP (pJB3Tc19). El incremento en la formación de biopelículas en superficies abióticas fue de 5 y 2.5 veces para Rle y Ret, respectivamente (Fig. 1.4).



**Figura 1.4. Formación de biopelículas de *Rhizobium etli* CFN42 (Ret) y *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle) expresando *pleD\** (pJBpleD\*) y el vector vacío (pJB3Tc19).** La cuantificación de las biopelículas se realizó tras tinción con cristal violeta (CV) de cultivos de 72 h en MM en placas multipocillo, en agitación a 28°C. Las barras representan la media de 8 pocillos  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes.

En el caso de Sme y Pto no fue posible determinar la formación de biopelículas por este método, ya que estas especies formaron películas en la interfase aire-líquido, débilmente unidas a las paredes de los pocillos, que durante el protocolo de tinción con CV colapsaron, imposibilitando su cuantificación.

### ***1.1.3. Impacto de elevados niveles intracelulares de c-di-GMP en la interacción rizobio-leguminosa***

Se analizó el impacto de altos niveles de c-di-GMP sobre tres asociaciones simbióticas diferentes: *Phaseolus vulgaris*-*R. etli* CFN42, *Vicia sativa*-*R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 y *Medicago sativa*-*S. meliloti* 8530. El uso de estas estirpes nos permitió determinar el efecto de este segundo mensajero en distintos tipos de interacciones simbióticas, las que dan lugar a la formación de nódulos determinados (*Ret-Phaseolus*) e indeterminados (*Rle-Vicia* y *Sme-Medicago*). Se cuantificó por un lado la capacidad de adhesión de las distintas cepas a las raíces de sus respectivas plantas hospedadoras, y por otro la eficiencia simbiótica mediante la determinación de parámetros como número y biomasa de nódulos, biomasa y contenido en N de la parte aérea de la planta.

### 1.1.3.1. Adhesión a raíces

La unión de los rizobios a las raíces de sus plantas leguminosas hospedadoras es un proceso esencial para la colonización de la raíz y el posterior establecimiento de una interacción simbiótica efectiva (Danhorn & Fuqua, 2007; Gage, 2004). Durante este proceso de unión de las bacterias a las raíces de sus plantas hospedadoras, juegan un papel clave los EPSs secretados por la bacteria.

Se realizaron ensayos de adhesión competitiva en los que mezclas 1:1 de las bacterias, con y sin *pleD\**, se pusieron en contacto con raíces de plántulas de leguminosas y se cuantificó la proporción de cada tipo de bacteria adherida a la raíz. Como se puede observar en la tabla 1.1, en las tres especies de rizobios ensayadas la sobreexpresión de *pleD\** provocó un aumento significativo de células adheridas en comparación con las cepas controles (pJB3Tc19). El caso más sorprendente lo encontramos en Ret, donde los altos niveles de c-di-GMP provocaron un aumento en la adhesión a las raíces de *P. vulgaris* (judía) de más de 100 veces, con respecto a condiciones fisiológicas de c-di-GMP.

### 1.1.3.2. Eficiencia simbiótica

Para evaluar los efectos de los altos niveles de c-di-GMP en distintas especies de rizobios (Ret, Rle y Sme) sobre la eficiencia simbiótica con sus respectivas plantas hospedadoras (judía, veza y alfalfa, respectivamente), se emplearon sistemas de cultivo hidropónico en jarras tipo Leonard. Cada plántula fue inoculada, en el momento del trasplante, con una suspensión bacteriana de aprox.  $10^6$  células de las cepas portando los plásmidos pJBpleD\* o pJB3Tc19 (consultar la sección IV del Materiales y Métodos).

- ***Interacción Sinorhizobium meliloti 8530 - Medicago sativa.***

La interacción Sme-alfalfa da lugar a la formación de nódulos indeterminados, que presentan un meristemo distal persistente y una forma ovoide o cilíndrica (Yang *et al.*, 1992). En este estudio, todas las plantas de alfalfa, tanto las inoculadas con la cepa Sme pJBpleD\* como con Sme pJB3Tc19, mostraron nódulos fijadores con un color rosáceo, indicativo de la fijación biológica del nitrógeno que estaba ocurriendo en su interior. El número y el tamaño de nódulos formados fue similar en ambos casos (Tabla 1.1). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el porte aéreo ni el

---

contenido de nitrógeno de las plantas inoculadas con la cepa Sme pJBpleD\* o Sme pJB3Tc19.

- **Interacción *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791-*Vicia sativa***

La interacción Rle-veza también da lugar a la formación de nódulos de tipo indeterminado. También en este caso los nódulos formados por ambas cepas mostraron color rosáceo, típico de nódulos fijadores. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número o tamaño de nódulos (Tabla 1.1), aunque hubo un ligero descenso del número de nódulos en las plantas inoculadas con la cepa Rle pJBpleD\*. Las plantas de veza inoculadas con la cepa que expresaba *pleD\**, a pesar de un porte aéreo ligeramente menor y un aspecto amarillento, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso seco de la parte aérea y en el contenido de nitrógeno, con las plantas inoculadas con la cepa control (Rle pJB3Tc19) (Tabla 1.1).

- **Interacción *Rhizobium etli* CFN42-*Phaseolus vulgaris***

En la interacción de Ret-judía se forman nódulos de tipo determinado, habitualmente esféricos. Esta relación simbiótica fue la más afectada por la expresión de la DGC PleD\*. Los nódulos de las plantas de judía inoculadas con las cepas portadoras de los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19 presentaron color rosado. Sin embargo, el número de nódulos de las plantas inoculadas con la cepa Ret pJBpleD\* fue significativamente menor que en las plantas inoculadas con la cepa control Ret pJB3Tc19 (Tabla 1.1). Por el contrario, el tamaño de estos nódulos era significativamente mayor, lo que podría ser una consecuencia del menor número de los mismos. Las plantas de judía inoculadas con la cepa Ret pJBpleD\* tenían un porte aéreo significativamente menor, presentaron un aspecto amarillento (Fig. 1.5 y Tabla 1.1) y, un menor contenido de nitrógeno, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa control (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1. Parámetros determinados en la interacción simbiótica**

<b>Planta</b>	<b>Rizobio</b>	<b>Adhesión<sup>a</sup></b>	<b>Nº de nódulos<sup>b</sup></b>	<b>Peso/nódulo<sup>c</sup></b>	<b>Peso seco parte aérea<sup>d</sup></b>	<b>Contenido nitrógeno<sup>e</sup></b>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ret pJB3Tc19	0,04 ± 0,01% <sup>†</sup>	301 ± 19 <sup>†</sup>	3,33 ± 0,24 <sup>†</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>†</sup>	35,35 ± 3,22 <sup>†</sup>
	Ret pJBpleD*	6,55 ± 0,73% <sup>†</sup>	203 ± 12 <sup>†</sup>	4,30 ± 0,42 <sup>†</sup>	0,66 ± 0,06 <sup>†</sup>	19,64 ± 3,29 <sup>†</sup>
<i>Vicia sativa</i>	Rle pJB3Tc19	8,34 ± 1,19% <sup>†</sup>	238 ± 33	0,73 ± 0,06	0,41 ± 0,09	9,93 ± 2,24
	Rle pJBpleD*	17,23 ± 2,63% <sup>†</sup>	190 ± 15	0,65 ± 0,12	0,30 ± 0,02	5,66 ± 0,40
<i>Medicago sativa</i>	Sme pJB3Tc19	0,19 ± 0,08 % <sup>†</sup>	80 ± 2	1,36 ± 0,12	0,44 ± 0,07	18,74 ± 3,89
	Sme pJBpleD*	6,30 ± 1,64 % <sup>†</sup>	72 ± 6	1,80 ± 0,19	0,43 ± 0,05	20,09 ± 3,00

<sup>a</sup> Porcentaje de bacterias adheridas por gramo de raíz

<sup>b</sup> Media del número de nódulos por planta

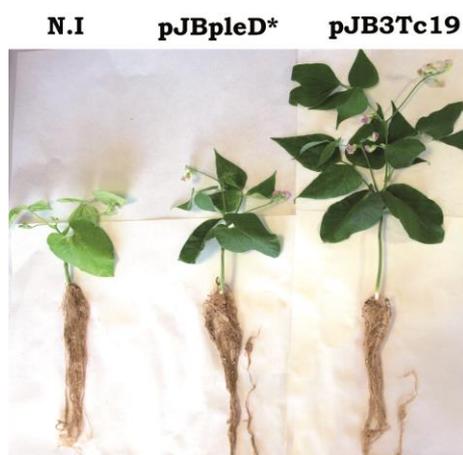
<sup>c</sup> Media del peso de cada nódulo por planta (mg)

<sup>d</sup> Media del peso seco por planta (g)

<sup>e</sup> Contenido de nitrógeno por planta (mg)

<sup>†</sup> Diferencias significativas según un test ANOVA (P≤0.05) entre las plantas inoculadas con las cepas que portan los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19

Tomando en conjunto los datos de las tres interacciones simbióticas, se deduce que los elevados niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP no afectan por igual a todas las interacciones simbióticas. Según nuestros resultados, los altos niveles de c-di-GMP conllevan una reducción de la eficiencia simbiótica en la interacción que culmina con la formación de nódulos determinados, como es caso de *P. vulgaris* con *R. etli* CFN42

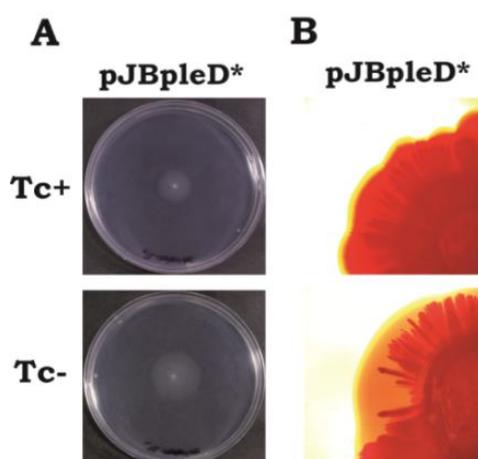


**Figura 1.5. Efecto de los altos niveles de c-di-GMP en la interacción *Rhizobium etli* CFN42 con *Phaseolus vulgaris*.** Plantas representativas de judía tras 29 días de la inoculación con las cepas de Ret indicadas. N.I., no inoculadas.

#### **1.1.4. Estabilidad de la construcción pJBpleD\***

Los resultados indicaban la eficacia de la construcción pJBpleD\* para conseguir incrementos significativos de los contenidos de c-di-GMP en las distintas especies bacterianas ensayadas. Sin embargo, durante la realización de algunos ensayos en vida libre, como los de motilidad tipo *swimming* o producción de polisacáridos, y tras una incubación prolongada observamos cierta inestabilidad de algunos fenotipos. Por ejemplo, tras 4-5 días las cepas que portaban el plásmido pJBpleD\* comenzaban a mostrar cierta motilidad o a aparecer sectores blancos en colonias que hasta entonces aparecían totalmente rojas en medios con CR. Esta inestabilidad fenotípica podría deberse a la inestabilidad del plásmido pJBpleD\*, que se pondría de manifiesto tras la pérdida de actividad del antibiótico en el medio. Un ensayo preliminar de motilidad *swimming* y de producción de EPS sobre CR, en presencia y ausencia de antibiótico, permitió corroborar la baja estabilidad de la construcción pJBpleD\* en ausencia de presión selectiva (Fig. 1.6).

Para cuantificar de forma más precisa la pérdida de la construcción pJBpleD\* en vida libre, se diseñó un experimento de crecimiento en medio líquido, en donde las cuatro especies bacterianas de estudio, portando las construcciones pJBpleD\* y pJB3Tc19, fueron cultivadas en medio sin Tc y mantenidas en fase exponencial durante al menos 100 generaciones, mediante diluciones diarias en medio nuevo. Tras este tiempo, se sembraron diluciones seriadas de cada cultivo en placas de medio selectivo y no selectivo. La estabilidad fue determinada como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) aparecidas en medio selectivo frente al total de UFC contabilizadas en medio no selectivo (Tabla 1.2). Es de destacar la baja estabilidad de ambos plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD\* en Sme y en Ret, que se mantuvieron en menos del 5% de las células tras 100 generaciones. El plásmido pJBpleD\* mostró mucha menor estabilidad que el plásmido vacío en Ret, Rle y Pto (Tabla 1.2), indicando la presión selectiva negativa que podría ejercer el gen *pleD\** en estas cepas en las condiciones ensayadas.



**Figura 1.6. Estabilidad de la construcción pJBpleD\* en ausencia de antibiótico.** Con la cepa Ret pJBpleD\* se realizaron ensayos de motilidad tipo *swimming* (A) y producción de exopolisacáridos sobre rojo Congo (B), en presencia o ausencia de tetraciclina. Las imágenes fueron tomadas tras 5 días de incubación a 28°C.

**Tabla 1.2. Estabilidad de los plásmidos pJB3Tc19 y pJBpleD\***

Cepas	Estabilidad en vida libre <sup>a</sup>
Ret pJB3Tc19	8,6%
Ret pJBpleD*	0,6%
Rle pJB3Tc19	73,5%
Rle pJBpleD*	67,1%
Sme pJB3Tc19	2,8%
Sme pJBpleD*	3,1%
Pto pJB3Tc19	100%
Pto pJBpleD*	76,8%

<sup>a</sup> Las bacterias fueron cultivadas durante al menos 100 generaciones en medio rico sin antibióticos. La estabilidad fue medida como el porcentaje de UFC en medio selectivo respecto al total de UFC en medio no selectivo.

La baja estabilidad de la construcción pJBpleD\* adquiriría especial importancia en ensayos *in planta* en donde la aplicación de antibióticos no es posible, pudiendo afectar al resultado de la interacción planta-bacteria. Por tanto, los resultados presentados en el apartado 1.1.3 podrían estar sesgados por la pérdida de la construcción pJBpleD\*. Por este motivo, se decidió evaluar la estabilidad de las construcciones pJBpleD\* y pJB3Tc19 *in planta*, tras la interacción simbiótica. Para ello, se tomaron 50 nódulos de plantas de judía, veza y alfalfa inoculadas por las cepas portadoras de los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19. Dichos nódulos se machacaron individualmente y el contenido se extendió en placas de medio rico con y sin antibiótico (Tc). Tras su crecimiento a 28°C durante 48-72 horas se determinó el porcentaje de permanencia de cada construcción. El caso más significativo lo encontramos de nuevo en Ret, donde no se recuperó ninguna colonia Tc<sup>f</sup> de los nódulos inoculados con la cepa Ret pJBpleD\* (0 de 50 nódulos), frente al 98 % de los nódulos inoculados con la cepa Ret pJB3Tc19, lo que indicaba, de nuevo, la importante inestabilidad de la construcción pJBpleD\* (Tabla 1.3). En el caso de Rle la estabilidad de los vectores pJB3Tc19 y pJBpleD\* fue mucho mayor en comparación con la estabilidad en Ret (86% y 70% respectivamente), aunque es importante resaltar que solo se recuperaron una o pocas colonias Tc<sup>f</sup> de la mayoría de nódulos formados por la cepa Rle pJBpleD\*, frente al crecimiento en masa obtenido a partir de nódulos de la cepa Rle pJB3Tc19 (Tabla 1.3). Esto sugería una pérdida muy

significativa del plásmido pJBpleD\* entre las poblaciones bacterianas de dichos nódulos.

Con respecto a Sme, al igual que en Ret, la estabilidad de las construcciones pJB3Tc19 y pJBpleD\* fue muy baja, especialmente para ésta última (51% y 22% respectivamente).

Estos datos, junto con la estabilidad de las construcciones en vida libre, sugerían que el plásmido pJBpleD\* no era una herramienta idónea para el mantenimiento de altos niveles intracelulares de c-di-GMP en condiciones de ausencia de presión selectiva. Además, la sobreexpresión de la DGC PleD\* en multicopia parecía ejercer una gran presión negativa en las bacterias, especialmente durante la interacción con la planta, lo que explicaría la mayor inestabilidad del plásmido pJBpleD\* respecto al vector pJB3Tc19.

**Tabla 1.3. Estabilidad de las construcciones *in planta*.**

Cepas	Estabilidad en simbiosis <sup>a</sup>
Ret pJB3Tc19	98%
Ret pJBpleD*	0%
Rle pJB3Tc19	86%
Rle pJBpleD*	70%
Sme pJB3Tc19	51%
Sme pJBpleD*	22%

<sup>a</sup> Porcentaje de nódulos que contienen bacterias con resistencia al antibiótico Tc.

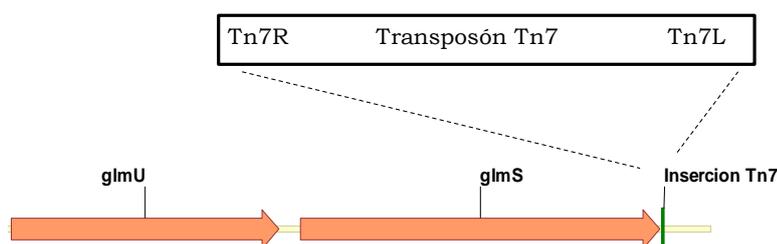
### **1.2 Incorporación estable y expresión del gen de la diguanilato ciclasa PleD\* en el genoma de bacterias que interaccionan con plantas.**

Habida cuenta de la inestabilidad del vector pJBpleD\*, se hacía necesario el uso de construcciones más estables que permitieran una evaluación más realista del impacto de los altos niveles de c-di-GMP sobre ciertas propiedades bacterianas, particularmente el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno. Por ello se abordó la construcción y ensayo de vectores mini-Tn7 para la introducción del gen *pleD\** en el genoma de nuestras bacterias modelo.

### 1.2.1. El transposón Tn7

El transposón Tn7 es un elemento genético móvil ampliamente utilizado en ingeniería genética para la introducción estable de genes en genomas bacterianos. Porta los genes necesarios para su transposición, *tnsABCDE*, los cuales se encuentran flanqueados por dos secuencias repetidas invertidas conocidas como Tn7R y Tn7L (DeBoy & Craig, 2000; Peters & Craig, 2001; Waddell & Craig, 1989). Es capaz de insertarse con una elevada frecuencia en un único sitio y con una única orientación dentro del genoma bacteriano. El sitio de inserción del Tn7 se conoce como *attTn7* y se encuentra generalmente aguas abajo del gen *glmS*, que codifica para una glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa. Este gen se encuentra muy conservado en la mayoría de las bacterias y es esencial, entre otros, para la síntesis de componentes de la pared celular (Peters & Craig, 2001).

La transposasa, encargada de la inserción del transposón, reconoce una secuencia dentro de la región codificadora del gen *glmS*. El lugar de inserción, sin embargo, ocurre unos 25 pb aguas abajo del codón de terminación de la traducción (Fig. 1.7), de forma que la inserción no suele causar ningún efecto negativo en la actividad de *glmS* ni sobre la viabilidad de las bacterias. La mayoría de las bacterias poseen una sola copia del gen *glmS*, aunque existen algunas excepciones como *Burkholderia mallei* que posee varias copias del mismo (Choi *et al.*, 2006). En otros casos, como en *Proteus mirabilis*, el genoma contiene sitios *attTn7* secundarios no asociados al gen *glmS* (Choi & Schweizer, 2006b).



**Figura 1.7. Orientación específica del transposón Tn7.** El lugar de la inserción ocurre aguas abajo del gen *glmS*. El extremo derecho Tn7R se sitúa justo aguas abajo del gen.

Basándose en estas propiedades del transposón Tn7, se han desarrollado diferentes vectores mini-Tn7 con distintos propósitos (Bao *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2001; Lambertsen *et al.*, 2004). Estos vectores permiten la

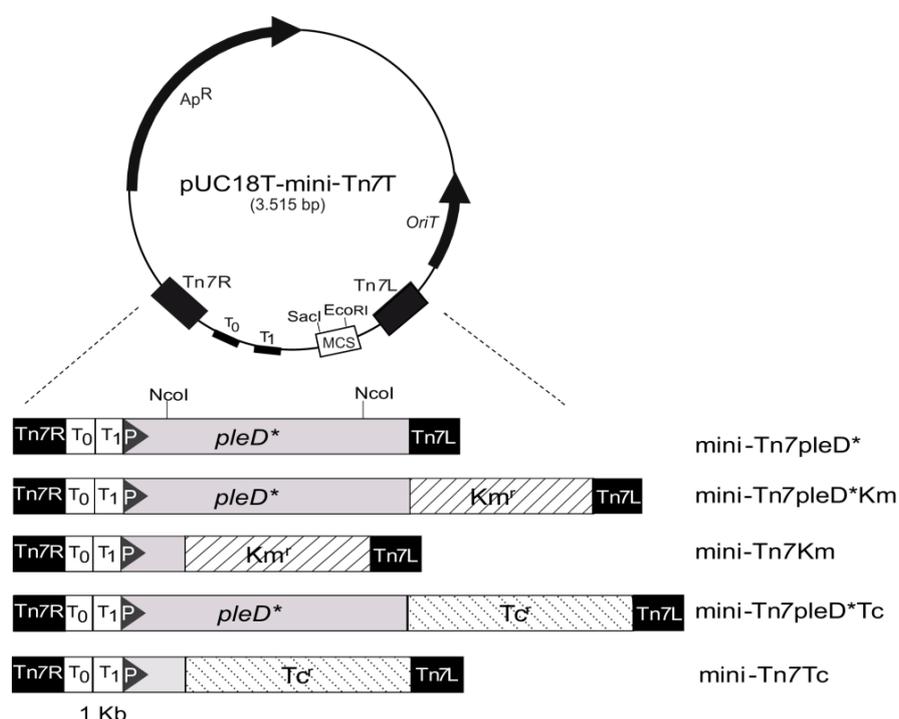
integración de genes en el genoma en una sola copia, lo que los convierte en útiles herramientas para el estudio de promotores, complementación génica y marcaje de bacterias en condiciones en que la selección con antibióticos está limitada.

### ***1.2.2. Construcción e introducción en el genoma de vectores mini-Tn7 portadores del gen *pleD*\****

El gen *pleD*\* bajo el control del promotor *Plac*, fue amplificado a partir del plásmido pJB*pleD*\*, empleando los oligonucleótidos pJB3Tc19F y *pleDTn7* (ver anexo 1). El fragmento de 1.785 pb obtenido se clonó en el vector de clonación pCR®-XL-TOPO® dando lugar al plásmido pTOPO-*pleD*\*, el cual fue secuenciado para comprobar que la polimerasa no hubiese cometido errores durante el proceso de amplificación. Posteriormente, el plásmido pTOPO-*pleD*\* fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SacI*, y el inserto que contenía el gen *pleD*\* se subclonó en el vector pUC18T-miniTn7T (Choi *et al.*, 2005) digerido previamente con las mismas enzimas. El plásmido resultante, mini-Tn7*pleD*\*, no es estable fuera del grupo de las enterobacterias ya que tiene un origen de replicación *colE1*, actuando como un vector suicida fuera de este grupo (Lambertsen *et al.*, 2004). Para evitar la posible toxicidad por la expresión del gen *pleD*\* en multicopia, el plásmido mini-Tn7*pleD*\* se introdujo en la cepa movilizadora de *E. coli*  $\beta$ 2155, que contiene un gen *lacI<sup>q</sup>* que permite mantener una baja expresión de *pleD*\* en ausencia de inductor (IPTG). Este plásmido se movilizó a nuestras bacterias modelo mediante cruces triparentales (ver apartado 1.5 de materiales y métodos), empleando la cepa  $\beta$ 2163 con el plásmido pUX-BF13 que codifica las funciones necesarias para la transposición. Las estirpes bacterianas receptoras empleadas fueron: *S. meliloti* 8530 (Sme), *R. etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle) y el fitopatógeno *P. syringae* pv. *tomato* (Pto).

En un primer abordaje se intentó la selección de transposantes sin selección de antibióticos, aprovechando que la expresión de *pleD*\* provoca un aumento de producción de EPS y la formación de colonias de color rojo intenso en medios con CR. No obstante, siguiendo este método de selección directa solo se pudieron aislar transposantes de *R. etli* (Ret Tn7*pleD*\*), bacteria con la que se obtuvieron los valores más altos de transposición. Estas colonias rojas aparecieron con una frecuencia de  $10^{-4}$

(ver tabla 1.4) y se distinguían fácilmente de las no transposantes, de color blanco. Para el resto de las especies, este método de selección no fue fructífero debido a la baja frecuencia de transposición del vector mini-Tn7pleD\*. Por ello, se decidió introducir genes de resistencia a antibióticos (Km y Tc) junto al gen *pleD\**, lo que facilitaría la selección de los transposantes. Los genes de resistencia a Km y Tc fueron extraídos de los vectores p34S-Km y p34S-Tc respectivamente, mediante la digestión con la enzima de restricción *KpnI*. Los correspondientes fragmentos de ADN fueron clonados en el vector mini-Tn7pleD\* adyacentes al gen *pleD\**, dando lugar a los plásmidos mini-Tn7pleD\*Km y mini-Tn7pleD\*Tc, respectivamente (Fig. 1.8).



**Figura 1.8. Vectores mini-Tn7 portadores de *pleD\**.** El gen *pleD\** bajo el control del promotor *lac*, junto a los genes de resistencia a Km y Tc, fueron clonados entre las secuencias Tn7R y Tn7L. Las construcciones con el gen *pleD\** deletado fueron obtenidas mediante digestión con la enzima *NcoI*. Ap<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup> y Tc<sup>r</sup>, genes de resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina respectivamente; MCS, sitio de clonación múltiple; T<sub>0</sub>T<sub>1</sub>, terminadores de la transcripción del bacteriófago λ y del operón *rrmB* de *E. coli* respectivamente; P, promotor *lac*.

Debido a la necesidad de contar con controles negativos adecuados y poder conocer los posibles efectos de la inserción del mini-Tn7 *per se*, se construyeron plásmidos mini-Tn7 carentes del gen *pleD\** activo. Para ello, a partir de los plásmidos mini-Tn7pleD\*Km y mini-Tn7pleD\*Tc, se realizó una deleción interna del gen *pleD\** con la enzima *NcoI*, eliminando 1.114 pb de los 1.380 pb del gen *pleD\**. Los plásmidos resultantes se denominaron mini-Tn7Km y mini-Tn7Tc, respectivamente.

Estas nuevas construcciones mini-Tn7 portadoras de genes de resistencia a antibióticos, fueron introducidas en el genoma de las estirpes seleccionadas mediante conjugaciones triparentales. Las frecuencias de inserción, representadas en la tabla 1.4, indicaron una baja eficiencia de inserción en todas las bacterias ensayadas, aunque se observó bastante variabilidad dependiendo de la cepa y de la construcción. Las eficiencias más bajas se encontraron en *R. leguminosarum* y *S. meliloti*. Estas dos bacterias producen una gran cantidad de exopolisacáridos, por lo que el proceso de conjugación pudo verse afectado por la presencia de este material denso y mucoso. Igualmente, de forma general, las construcciones que portaban el gen *pleD\** presentaron una menor eficiencia de transposición, probablemente debido a su mayor tamaño (Tabla 1.4). Además, la eficiencia de transposición fue mayor para las construcciones con el gen de resistencia a Km que para las Tc<sup>r</sup>.

**Tabla 1.4. Frecuencias de transposición de las construcciones mini-Tn7.**

Cepa	Construcción mini-Tn7	Frecuencia
<i>R. etli</i> CFN42	Tn7pleD*	$3,0 \times 10^{-4}$
	Tn7pleD*Km	$6,5 \times 10^{-6}$
	Tn7Km	$5,2 \times 10^{-6}$
	Tn7pleD*Tc	$9,8 \times 10^{-8}$
	Tn7Tc	$5,1 \times 10^{-6}$
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> UPM791	Tn7pleD*Km	$2,5 \times 10^{-8}$
	Tn7Km	$4,8 \times 10^{-8}$
	Tn7pleD*Tc	$< 10^{-9}$
<i>S. meliloti</i> 8530	Tn7Tc	$1,8 \times 10^{-9}$
	Tn7pleD*Km	$4 \times 10^{-8}$
	Tn7Km	$8 \times 10^{-8}$
	Tn7pleD*Tc	$3,5 \times 10^{-9}$
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Tn7Tc	$2,3 \times 10^{-8}$
	Tn7pleD*Km	$1,6 \times 10^{-7}$
	Tn7Km	$4,8 \times 10^{-5}$
	Tn7pleD*Tc	$7 \times 10^{-8}$
	Tn7Tc	$2 \times 10^{-5}$

### 1.2.3. Comprobación de las inserciones mini-Tn7

Como se ha explicado con anterioridad, la inserción de las construcciones mini-Tn7 tiene lugar aguas abajo del gen *glmS*. Gracias a la disponibilidad de secuencia de los genomas de *R. etli* CFN42 (González *et al.*, 2006), *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 (Young *et al.*, 2006), *S. meliloti* 1021 (Capela *et al.*, 2001) y *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Buell *et al.*, 2003), se identificó el gen *glmS* en cada una de estas especies. En Pto se encuentra anotado un gen *glmS* (PSPTO\_5595). El genoma de Ret presenta dos genes *glmS*, anotados como *glmS1* y *glmS2*, ambos de localización cromosómica (RHE\_CH02091 y RHE\_CH04036 respectivamente). Los genomas de Rle y Sme contienen dos genes con actividad glucosamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, *glmS* y *nodM*. El gen *glmS* tiene una localización cromosómica (RL2382 y SMC00231 para Rle y Sme, respectivamente), mientras que el gen *nodM* se localiza en los plásmidos simbióticos de Rle (pRL100180) y Sme (SMA0878).

Con el fin de determinar el sitio *attTn7* en cada especie, realizamos un alineamiento de esta región, tanto para los genes *glmS* como *nodM*, de cada especie, comparando la secuencia con otros sitios *attTn7* anteriormente descritos en otras bacterias como *P. aeruginosa* (Pae) y *E. coli* (Eco) (Jittawuttipoka *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Waddell & Craig, 1989) (Fig. 1.9).

glmS Pae	GACCAGCCGCGCAACCTGGCCAAGTCGGTCACCGTCGAGTAA
glmS Pto	GACCAGCCGCGGAATCTGGCGAAGTCGGTGACGGTGGAGTGA
glmS Eco	GACCAGCCGCGTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAA
nodM Sme	GACCAGCCGCGCAACCTTGCGAAATCGGTAACGGTCGAA TGA
glmS Sme	GACCAGCCGCGCAACCTCGCCAAATCGGTGACGGTCGAA TGA
glmS Rle	GACCAGCCGCGCAACCTGGCGAAATCGGTGACCGTGGAA TAA
NodM Rle	GACCAGCCGCGGAATCTAGCTAAATCGGTGACAGTCGAA TGA
glmS1 Ret	GATCAGCCCGCAATCTGGCGAAATCCGTGACTGTGGAGTAA
glmS2 Ret	GACCGGCCGCGCAACCTGCTGAAGGTGACGGAGACGGTCTGA

**Figura 1.9. Alineamiento de los sitios *attTn7* de los genes *glmS* y *nodM* de diferentes bacterias.** El hipotético sitio *attTn7* reconocido por la transposasa se muestra subrayado. En negrita se muestra el codón de parada de los ORFs *glmS* y *nodM*. En amarillo están marcados los nucleótidos invariables y en azul los fuertemente conservados. Pae, *Pseudomonas aeruginosa*; Pto, *P. syringae* pv. tomato DC3000; Eco, *Escherichia coli*; Sme, *Sinorhizobium meliloti*; Rle, *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae; Ret, *R. etli* CFN42.

La figura 1.9 muestra el alineamiento de secuencias *attTn7* en genes *glmS* y *nodM*. El sitio *attTn7* de Pto presenta un 86.7% y un 83.3% de identidad con respecto al sitio *attTn7* de Pae y Eco, respectivamente. En los casos de Sme y Rle, tanto el gen *glmS* como el gen *nodM* contienen posibles sitios *attTn7*. Ret presenta dos genes *glmS*

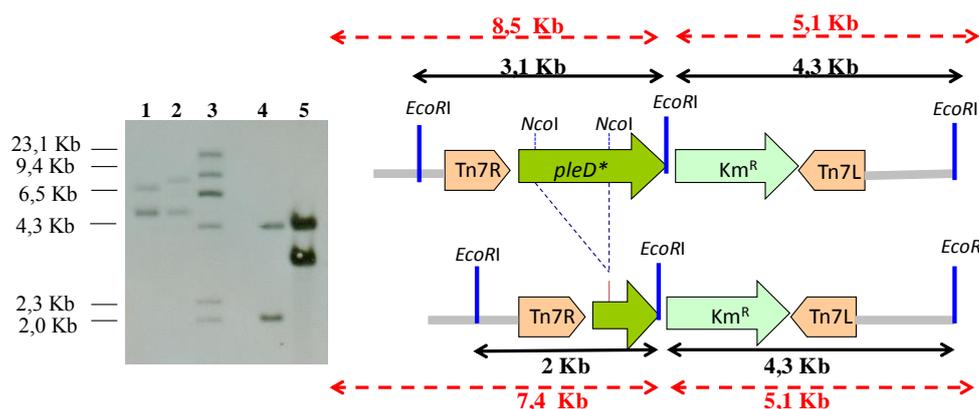
anotados (*glmS1* y *glmS2*), pero solo el primero de ellos parece contener un sitio *attTn7*. El gen *glmS2* es de menor tamaño que *glmS1* (1032 pb y 1827 pb, respectivamente). Además, el posible sitio *attTn7* en *glmS2* muestra solo un 58.7 % de secuencia conservada respecto a los de Pae y Eco, frente al 78.6 % de secuencia conservada en *glmS1*.

- **Verificación de las inserciones mediante PCR**

El sitio teórico de la inserción se identificó situado a unos 25 pb a partir del codón de parada de cada gen *glmS* o *nodM*. Se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos para cada especie, aguas arriba y aguas abajo del sitio teórico de inserción (ver anexo 1). Al realizar una reacción de PCR se obtuvieron fragmentos de unos 600 pb en las cepas silvestres pero no para los transposantes. Por otro lado, como la orientación del Tn7 tras la inserción es conocida, utilizando un oligonucleótido interno del Tn7, pTn7R y uno de los oligonucleótidos de la región *glmS* o *nodM*, se pudo comprobar la presencia de las construcciones mini-Tn7 aguas abajo del gen *glmS* o *nodM* en los casos de Sme y Rle.

- **Verificación de las inserciones mediante hibridación ADN-ADN.**

Numerosos estudios demuestran que la inserción del transposón Tn7 es única y que ocurre en una misma orientación en diversas bacterias (Barnes *et al.*, 2008; Lambertsen *et al.*, 2004; McKenzie & Craig, 2006). No obstante, con el fin de verificar la localización y orientación de las inserciones, se realizó una hibridación de los ADN genómicos de las cepas Pto Tn7Km, Pto Tn7pleD\*Km, Sme Tn7Km y Sme Tn7pleD\*Km, digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* frente a ADN del plásmido mini-Tn7pleD\*Km digerido con *EcoRI* y marcado con digoxigenina. Puesto que la secuencia del mini-Tn7 contiene un sitio interno *EcoRI*, la digestión del ADN provoca su rotura dando lugar a la aparición de dos bandas de hibridación (Fig. 1.10). Los resultados mostraron que la inserción del transposón era única, orientada y localizada aguas abajo del gen *glmS* para Pto y mayoritariamente asociada el gen *nodM* para Sme, de acuerdo con el tamaño de los fragmentos de hibridación.



**Figura 1.10.** Verificación, mediante hibridación ADN-ADN del número, orientación y localización de las inserciones mini-Tn7 en el genoma de *Pseudomonas syringae* pv. tomato y *Sinorhizobium meliloti*. Carril 1: Pto Tn7Km, carril 2: Pto Tn7pleD\*Km, carril 3: marcador, carril 4: Sme Tn7Km, carril 5: Sme Tn7pleD\*Km. En líneas negras se muestran los tamaños correspondientes a las bandas de hibridación para Sme, mientras que en líneas rojas discontinuas se muestran los tamaños para Pto. El esquema representativo no está a escala.

#### 1.2.4. Identificación de eventos de transposición asociados al gen *glmS* en *Sinorhizobium meliloti* 8530

El punto de inserción de los mini-Tn7 para *R. leguminosarum* bv. viciae y *P. syringae* pv. tomato DC3000 se encontraba mayoritariamente bajo el gen *glmS*. Con respecto a *R. etli* CFN42, todas las inserciones analizadas se encontraban bajo el *glmS1* y ninguna bajo *glmS2*.

Sin embargo, en *S. meliloti* 8530, que es una de las especies que presentó una menor frecuencia de transposición, todas las inserciones analizadas parecían haber ocurrido en la región intergénica *nodM-nolF*. Estos resultados concordaban con estudios previos, que indicaban la preferencia del transposón Tn7 por el sitio *attTn7* localizado en el plásmido simbiótico pSymA (Bolton *et al.*, 1984). Los genes *nodM* y *nolF* forman parte del operón *nodMnolFGnodN*, localizado en el plásmido simbiótico pSymA e implicado en la eficiencia de la nodulación y en el rango de hospedador de *S. meliloti* (Baev *et al.*, 1991). *nodM* es un alelo de *glmS* que se encuentra en la mayoría de los rizobios nodulantes de leguminosas y codifica para una proteína con secuencia y función similar a GlmS. La gran diferencia entre *nodM* y *glmS* está en su perfil de expresión. El gen *nodM* se expresa principalmente en presencia de flavonoides de la planta, estrategia dirigida a garantizar la producción de N-acetil-glucosamina necesaria para la síntesis de factores de nodulación (FN) durante las primeras etapas de la simbiosis (Baev *et al.*, 1992). En estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, los

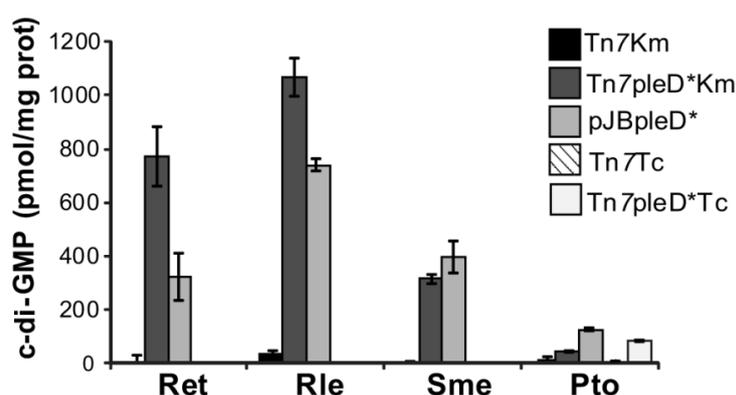
transposantes de Sme con las inserciones bajo el gen *nodM*, presentaban una menor eficiencia simbiótica en comparación con la cepa silvestre (datos no mostrados). La mera inserción del mini-Tn7 en esta región, por tanto, generaba una reducción significativa de la cinética de nodulación y del número de nódulos totales. Aunque la integridad del gen *nodM* no se ve afectada, la inserción podría estar provocando problemas de expresión de los genes que se encuentran aguas abajo (Bolton *et al.*, 1984).

Con el fin de evitar estos problemas de interferencia con la simbiosis, se realizó la búsqueda de inserciones localizadas bajo el gen *glmS*, mediante PCR en colonia con la pareja de oligonucleótidos específica para el gen *nodM*, pTn7L y Rm\_NodM. Esta estrategia se utilizó solo para transposantes de mini-Tn7pleD\*Km y mini-Tn7Km, debido a la baja eficiencia de transposición de las construcciones portadoras de resistencia a Tc. La obtención de una banda de 367 pb sería indicativa de la inserción asociada a *nodM*, descartando todos estos transposantes. Con aquellos transposantes que fueron negativos para dicha banda, se procedió con una segunda PCR con la pareja de oligonucleótidos específica para el gen *glmS*, pTn7L y glmS\_rmR. Si la inserción ocurría bajo *glmS*, se obtendría un amplicón de 476 pb. Para la obtención de la cepa Sme Tn7Km con la inserción bajo *glmS* fue necesario analizar 18 colonias, mientras que para identificar una cepa Sme Tn7pleD\*Km fue necesario el análisis de 72 colonias, lo que daba una frecuencia de transposantes bajo *glmS* de 5.5% y 1.4%, respectivamente. Además, el producto de 476 pb obtenido por amplificación con los oligonucleótidos pTn7L y glmS\_rmR fue secuenciado, lo cual corroboró que la inserción se encontraba bajo el gen *glmS*.

### ***1.2.5. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP en los transposantes mini-Tn7.***

Para comprobar la funcionalidad de las inserciones mini-Tn7, se cuantificaron los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP. Debido al elevado coste de la cuantificación, se tomaron como cepas representativas los transposantes Km<sup>r</sup> de las cuatro especies de estudio. Los valores obtenidos para los transposantes de PleD\* fueron comparados con los obtenidos en las cepas control sin PleD\* (Tn7Km) y con los de las cepas portadoras del plásmido pJBpleD\*. Como se muestra en la figura 1.11, los transposantes Tn7pleD\*Km mostraron un gran incremento de los niveles intracelulares

de c-di-GMP en comparación con las cepas control Tn7Km, siendo incluso más elevados que los niveles producidos por el plásmido pJBpleD\* en Rle y Ret. El caso más significativo lo encontramos en Ret, donde el transposante Ret Tn7pleD\*Km mostró un incremento de los niveles de c-di-GMP de 230 veces en comparación con la cepa control Ret Tn7Km.



**Figura 1.11. Cuantificación de los niveles intracelulares de c-di-GMP.** Cantidad de c-di-GMP en *R. etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle), *S. meliloti* 8530 (Sme) y *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Pto) portando *pleD\** en el cromosoma o en multicopia (pJBpleD\*). Cada valor es la media de 3 réplicas biológicas. Las barras representan el error típico.

Sin embargo, se detectó un modesto incremento de sólo 3 veces en los niveles de c-di-GMP en la cepa Pto Tn7pleD\*Km, que a su vez fueron 3 veces menores que los niveles de la cepa portadora del gen *pleD\** en multicopia (Pto pJBpleD\*). Para descartar cualquier problema con el transposante kanamicina, decidimos medir los niveles intracelulares de c-di-GMP de un transposante tetraciclina de esta cepa (Tn7pleD\*Tc). En este caso se midió un incremento de 2 veces en los niveles de c-di-GMP en comparación con la cepa Pto Tn7pleD\*Km, con valores más cercanos a los determinados en Pto pJBpleD\* (Fig. 1.11).

Para conocer porqué los distintos transposantes (Tn7pleD\*Km y Tn7pleD\*Tc) de Pto presentaban estas importantes diferencias en los niveles de c-di-GMP, se determinó la expresión del gen *pleD\** en ambos transposantes mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que el transposante Pto Tn7pleD\*Km presentaba un expresión 3,7 veces menor que la cepa Pto Tn7pleD\*Tc, lo que sugería que las diferencias en la cantidad de c-di-GMP entre ambos transposantes eran debidas a una menor expresión del gen *pleD\** en el transposante Km.

**1.2.6. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7pleD\* vs. pJBpleD\* en bacterias en vida libre**

Existen numerosos trabajos en la literatura donde la eficacia y la estabilidad del transposón Tn7 han sido ya probadas en diversas bacterias Gram-negativas (Crepin *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2005; Ely, 1982; Kumar *et al.*, 2010). No obstante era necesario verificar la estabilidad de las construcciones mini-Tn7 en ausencia de presión selectiva por antibiótico, por lo que se realizó un ensayo análogo al descrito anteriormente en el apartado 1.1.4 (Tabla 1.2), donde todas las bacterias portadoras de los mini-Tn7, se crecieron durante al menos 100 generaciones en ausencia de antibiótico.

**Tabla 1.5. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7**

<b>Cepas</b>	<b>Estabilidad en vida libre<sup>a</sup></b>
Ret pJB3Tc19	8,6%
Ret pJBpleD*	0,6%
Ret Tn7Km	100%
Ret Tn7pleD*Km	100%
Ret Tn7Tc	100%
Ret Tn7pleD*Tc	100%
Rle pJB3Tc19	73,5%
Rle pJBpleD*	67,1%
Rle Tn7Km	100%
RleTn7pleD*Km	100%
Rle Tn7Tc	100%
Rle Tn7pleD*Tc	n.d
Sme pJB3Tc19	2,8%
Sme pJBpleD*	3,1%
Sme Tn7Km	100%
Sme Tn7pleD*Km	100%
Sme Tn7Tc	100 %
Sme Tn7pleD*Tc	100 %
Pto pJB3Tc19	100%
Pto pJBpleD*	76,8%
Pto Tn7Km	100%
Pto Tn7pleD*Km	100%
Pto Tn7Tc	100%
Pto Tn7pleD*Tc	100%

<sup>a</sup>Las bacterias fueron crecidas durante al menos 100 generaciones en medio rico sin antibióticos. La estabilidad fue medida como el porcentaje de UFC contabilizadas en medio selectivo respecto al total de UFC en medio no selectivo; n.d, no determinado.

En la Tabla 1.5, se recogen los datos de estabilidad de los distintos transposantes y, a modo comparativo, se han incluido igualmente los valores de estabilidad de sus respectivas versiones en multicopia (pJBpleD\* y pJB3Tc19) procedentes de la Tabla 1.2. Contrastando con la baja estabilidad mostrada por las versiones plasmídicas, todas las construcciones mini-Tn7, tanto con *pleD\** como los controles sin *pleD\**, fueron 100% estables en todas las cepas. Estos datos claramente demuestran que las construcciones mini-Tn7, debido a su gran estabilidad, especialmente en ausencia de presión selectiva, son herramientas más apropiadas que el vector pJBpleD\* para aumentar los niveles del segundo mensajero c-di-GMP.

### ***1.2.7. Impacto de los altos niveles de c-di-GMP en vida libre.***

Una vez comprobados los puntos de inserción de los vectores mini-Tn7 y la funcionalidad del gen *pleD\** para incrementar los niveles intracelulares de c-di-GMP, se procedió a la caracterización fenotípica de los transposantes y su comparación con las cepas portadoras de los vectores pJBpleD\*.

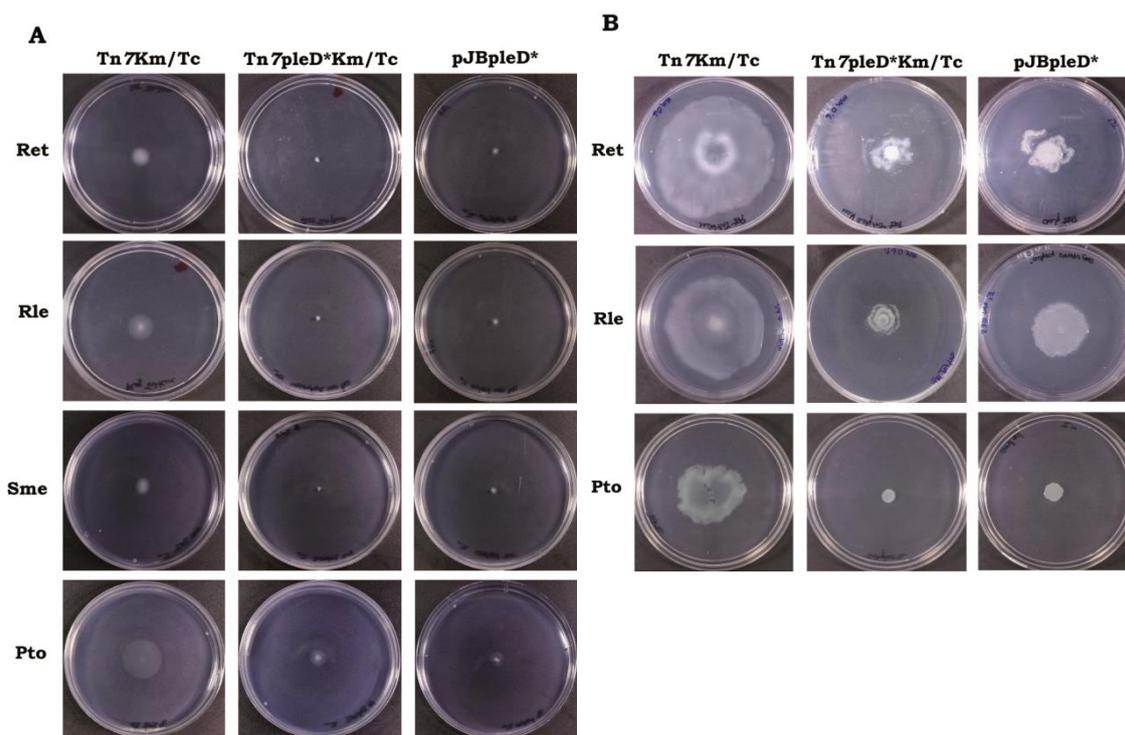
#### ***1.2.7.1. Motilidad bacteriana***

Para comprobar si los transposantes PleD\* presentaban niveles reducidos de motilidad similares a las cepas que expresaban *pleD\** en multicopia, realizamos ensayos de motilidad tipo *swimming* y tipo *swarming*. En el caso de los rizobios, se ensayaron los transposantes Km<sup>r</sup> como cepas representativas, mientras que en el caso de Pto se ensayaron los transposantes Tc<sup>r</sup> por presentar mayor contenido de c-di-GMP.

Como se aprecia en la Figura 1.12, el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP provocó una inhibición casi total de la motilidad tipo *swimming* (A) y la motilidad en superficie (B), tanto cuando *pleD\** se encontraba en monocopia (Tn7pleD\*Km/Tc) como en multicopia (pJBpleD\*), en las cuatro especies estudiadas.

En el caso de Pto, a pesar de que los niveles de c-di-GMP eran menos elevados en los transposantes que en la derivada portadora del plásmido pJBpleD\*, se observó una reducción similar de la motilidad, tanto *swimming* como *swarming*. Esto sugería que los niveles intracelulares de los transposantes, aun siendo más bajos, eran suficientes para provocar dicha reducción.

En el caso de Sme, debido a la gran producción de exopolisacáridos secretados por la cepa empleada en condiciones nativas, no se pudieron realizar ensayos de motilidad en superficie.



**Figura 1.12. Impacto de las inserciones Tn7pleD\* vs. pJBpleD\* sobre la motilidad bacteriana.** A). Motilidad tipo *swimming* de transposantes mini-Tn7 y de las cepas portando el plásmido pJBpleD\*. El halo de motilidad se midió tras 3 días de incubación a 28°C para los rizobios y 24 horas para *Pseudomonas* en placas de medio Bromfield semisólido (0.3% agar). B) Motilidad en superficie o tipo *swarming* sobre placas de medio mínimo (0.6% agar) crecidas durante 3 días a 28°C para los rizobios y 24 horas para *Pseudomonas*. *Rhizobium etli* CFN42 (Ret), *R. leguminosarum* bv. viciae UPM791 (Rle), *Sinorhizobium meliloti* 8530 (Sme) y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto).

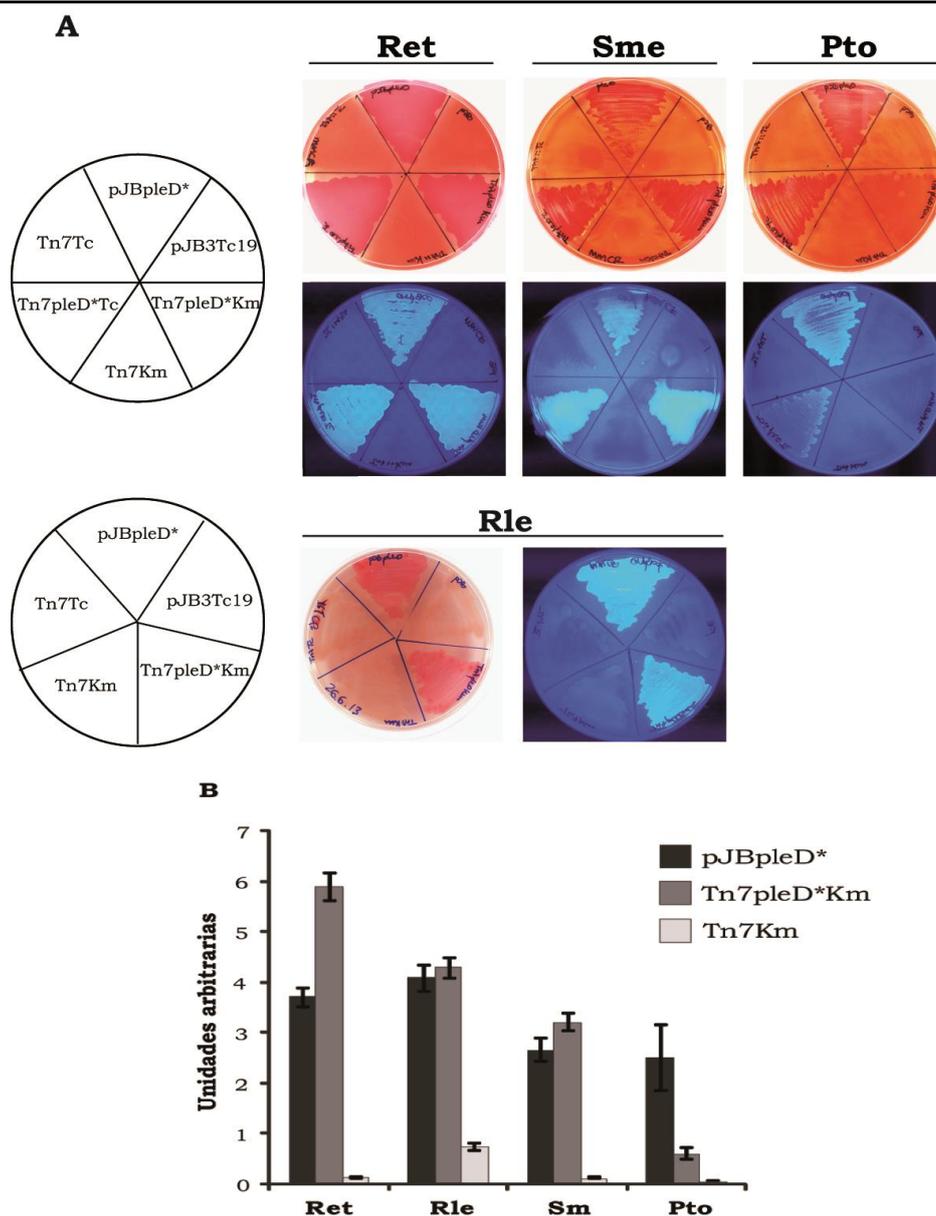
### 1.2.7.2. Producción de exopolisacáridos

Para comprobar si los transposantes mini-Tn7pleD\* de las 4 especies bacterianas mostraban una producción aumentada de EPSs, todos los transposantes mini-Tn7 con y sin *pleD\** y las cepas portadoras de los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19, fueron crecidas sobre medio sólido adicionado de CR o CF. En las tres especies de rizobios, las colonias de los transposantes mini-Tn7pleD\*, tanto Tc<sup>r</sup> como Km<sup>r</sup>, presentaron el mismo comportamiento que las cepas con *pleD\** en multicopia: color rojo intenso y aspecto rugoso en medio CR (Fig. 1.13 A), y color azul brillante bajo luz ultravioleta en medio con CF (Fig. 1.13 A).

---

En el caso de los transposantes de Pto, solo la cepa Pto Tn7pleD\*Tc mostró un comportamiento similar a la cepa con el plásmido pJBpleD\*, tanto sobre CR como sobre CF. El transposante Pto Tn7pleD\*Km mostró un color rojo ligeramente más intenso que la cepa control Pto Tn7Km sobre CR, mientras que no presentó ningún aumento visualmente apreciable de fluorescencia bajo luz ultravioleta en medio con CF (Fig. 1.13 A). Estos datos concordaban con los niveles intracelulares de c-di-GMP y de expresión del gen *pleD\** en los transposantes de Pto, descritos anteriormente.

También se cuantificó la producción de EPSs por los transposantes, mediante la medición de la fluorescencia de los cultivos en medio mínimo líquido suplementado con CF. Como se muestra en la figura 1.13B, la expresión de *pleD\**, tanto en monocopia como en multicopia, provocó un aumento significativo de la fluorescencia debida a la producción de exopolisacáridos, siendo la fluorescencia de los transposantes similar o incluso mayor que las cepas portadoras del vector pJBpleD\*. De nuevo, la cepa Pto Tn7pleD\*Km fue la que mostró un menor aumento de fluorescencia con respecto a la cepa control Pto Tn7Km. Es importante resaltar, sin embargo, que este discreto pero significativo aumento indica claramente que la cuantificación de exopolisacáridos mediante la medición de la fluorescencia en medio líquido, es más sensible y precisa que la simple observación visual del crecimiento de las respectivas cepas en medio sólido suplementado con los tintes específicos.



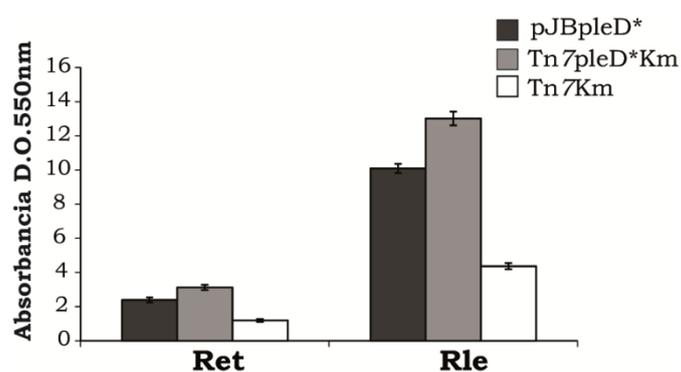
**Figura 1.13. Efecto de las inserciones Tn7pleD\* en la producción de exopolisacáridos.** A) Crecimiento en masa sobre medio sólido suplementado con rojo Congo (CR, 125 µg/ml) y calcoflúor (CF, 200 µg/ml) de las distintas cepas sobreexpresando *pleD\**, en monocopia y multicopia (Tn7pleD\*Km/Tc y pJBpleD\* respectivamente) y las cepas control sin *pleD\** (Tn7Km/Tc y pJB3Tc19 respectivamente). Las fotografías fueron tomadas después de 72 horas de incubación a 28°C para los rizobios y 20°C para Pto. Para el medio con CF, las fotografías se tomaron bajo luz ultravioleta. B) Cuantificación de la fluorescencia producida por cultivos bacterianos en medio mínimo líquido, durante 48h a 28°C para los rizobios y 24h a 20°C para Pto. Las barras representan el error estándar de tres replicas biológicas. Ret, *Rhizobium etli* CFN42; Rle, *R. leguminosarum* bv. viciae UPM791; Sme, *Shinorhizobium meliloti* 8530; Pto, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

### 1.2.7.3. Formación de biopelículas

Como ya se ha mencionado anteriormente, en el caso de Sme y Pto fue imposible cuantificar la formación de biopelículas con CV, ya que estas especies formaron

películas superficiales y débilmente unidas a las paredes de los pocillos de microplacas, por lo que durante el protocolo de tinción con CV las biopelículas colapsaban y eran parcialmente eliminadas, dando lugar a medidas erróneas (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014).

La capacidad de formación de biopelículas de los transposantes kanamicina de Ret y Rle fue comparada con la de la cepa portadora de *pleD*\* en multicopia (pJB*pleD*\*) y la cepa control Tn7Km. La formación de biopelículas fue cuantificada después de 72 horas de crecimiento en medio mínimo, en agitación, en placas multipocillo de poliestireno (para más información ver el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos). En ambas especies, los transposantes expresando *pleD*\* desde el cromosoma fueron capaces de formar una biopelícula similar o superior a la de las cepas expresando *pleD*\* en multicopia (Fig. 1.14), revelando de nuevo la idoneidad de las construcciones mini-Tn7 para la elevación de los niveles intracelulares de c-di-GMP en estas bacterias.



**Figura 1.14.** Efecto de las inserciones Tn7*pleD*\* vs. pJB*pleD*\* en la formación de biopelículas en *Rhizobium etli* CFN42 (Ret) y *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 (Rle). Formación de biopelículas por las bacterias con *pleD*\* integrado en el cromosoma (Tn7*pleD*\*Km), en *trans* (pJB*pleD*\*) o sin *pleD*\* (cepa control Tn7Km). Las biopelículas formadas tras 72 horas de cultivo en MM en agitación a 28°C, en placas multipocillo, fueron determinadas tras tinción con cristal violeta (CV). Las barras representan la media de 8 pocillos  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes.

### 1.2.8. Estabilidad de las construcciones mini-Tn7*pleD*\* in planta

Para determinar la estabilidad de las inserciones cromosómicas mini-Tn7*pleD*\* *in planta*, se inocularon plantas de judía, veza y alfalfa con sus respectivos rizobios portando las inserciones Tn7*pleD*\*Km y Tn7Km. En cada caso se tomaron 50 nódulos, se machacaron individualmente y el contenido se extendió en placas de medio rico con y sin antibiótico, para determinar el porcentaje de permanencia de los mini-Tn7 tras la interacción simbiótica. En la Tabla 1.6 se han incluido, a modo comparativo, los

resultados de las versiones multicopia (pJBpleD\* y pJB3Tc19; tabla 1.3) de las distintas cepas.

La escasa o nula estabilidad del vector pJBpleD\* tras la interacción simbiótica, especialmente en Sme y Ret, con un 22% y un 0% respectivamente, contrastó con la elevada estabilidad mostrada por las inserciones mini-Tn7, ya que se pudieron recuperar bacterias Km<sup>r</sup> de la inmensa mayoría (90-100 %) de los nódulos analizados. Los transposantes Tn7pleD\*Km de Sme y Ret mostraron una estabilidad ligeramente menor *in planta* (90%) que en vida libre (100%), lo que de nuevo sugería que durante la interacción simbiótica, y particularmente en nódulos, existe algún tipo de presión selectiva negativa contra bacterias con altos niveles de diguanilato cíclico.

En las tres especies de rizobios ensayadas, las construcciones mini-Tn7pleD\* fueron herramientas más adecuadas que el plásmido pJBpleD\* para elevar los niveles intracelulares de c-di-GMP. Su alta estabilidad en ausencia de antibiótico convierte a estos mini-Tn7pleD\* en potentes herramientas para la realización de estudios *in planta* u otro tipo de ambientes, donde el uso de antibióticos está limitado.

**Tabla 1.6. Estabilidad de las construcciones *in planta***

<b>Cepas</b>	<b>Estabilidad en simbiosis <sup>a</sup></b>
Ret Tn7Km	100%
Ret Tn7pleD*Km	90%
Ret pJB3Tc19	98%
Ret pJBpleD*	0%
Rle Tn7Km	100%
RleTn7pleD*Km	100%
Rle pJB3Tc19	86%
Rle pJBpleD*	70%
Sme Tn7Km	100%
Sme Tn7pleD*Km	91%
Sme pJB3Tc19	51%
Sme pJBpleD*	22%

<sup>a</sup> Porcentaje de nódulos que contienen bacterias con resistencia al antibiótico de selección.

---

### ***1.2.9. Impacto de las construcciones mini-Tn7pleD\* vs. pJBpleD\* en la interacción rizobio-leguminosa.***

Para determinar la eficiencia simbiótica de los transposantes mini-Tn7pleD\*, se inocularon plantas hospedadoras con los transposantes Tn7pleD\*Km y Tn7Km de las tres especies de rizobios. Se analizó la capacidad de adhesión de las distintas cepas a las raíces de sus plantas hospedadoras y se evaluó el desempeño simbiótico tras la determinación de parámetros como el número y masa de los nódulos y el peso y contenido en nitrógeno de la parte aérea de las plantas. Los resultados se compararon con los obtenidos con las cepas portadoras de los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19 (Tabla 1.1).

#### *1.2.9.1. Adhesión a raíces*

Se realizaron ensayos de adhesión competitiva con los transposantes Tn7pleD\*Km y Tn7Km de las tres especies de rizobios. Mezclas (1:1) de las bacterias se pusieron en contacto con raíces de plántulas de judía, veza o alfalfa para Ret, Rle y Sme, respectivamente. Tras 4 horas de contacto, se cuantificaron los transposantes Tn7pleD\*Km y Tn7Km adheridos a la raíz. Como se puede observar en la Tabla 1.7, en las tres especies se observó un significativo incremento de células con altos niveles de diguanilato adheridas a raíces respecto a las bacterias con niveles fisiológicos de c-di-GMP (Tn7Km). Este efecto sobre la adhesión a raíces vegetales fue similar al mostrado por el plásmido pJBpleD\*.

#### *1.2.9.2. Eficiencia simbiótica*

Para evaluar el comportamiento simbiótico de los transposantes mini-Tn7 en las tres especies de estudio, se realizaron ensayos de nodulación con sus respectivas plantas hospedadoras. Como cepas representativas, se emplearon los transposantes Km<sup>r</sup>, con y sin PleD\*.

En la tabla 1.7, se muestran los datos obtenidos para los parámetros determinados tras la interacción simbiótica. Además, para facilitar la comparación de los mismos, se muestran los resultados obtenidos por las plantas inoculadas con los vectores pJB3Tc19 y pJBpleD\*.

**Tabla 1.7. Comportamiento simbiótico de distintas variantes de rizobios con altos niveles de c-di-GMP.**

Planta	Rizobio	Adhesión <sup>a</sup>	Nº de nódulos <sup>b</sup>	Peso/nódulo <sup>c</sup>	Peso seco parte aérea <sup>d</sup>	Contenido de nitrógeno <sup>e</sup>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ret Tn7Km	0,02 ± 0,01% <sup>††</sup>	310 ± 20 <sup>††</sup>	3,62 ± 0,19 <sup>††</sup>	1,08 ± 0,08 <sup>††</sup>	41,34 ± 7,37 <sup>††</sup>
	Ret Tn7pleD*Km	2,19 ± 0,37% <sup>††</sup>	188 ± 13 <sup>††</sup>	5,50 ± 0,42 <sup>††</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>††</sup>	19,50 ± 3,20 <sup>††</sup>
	Ret pJB3Tc19	0,04 ± 0,01% <sup>†</sup>	301 ± 19 <sup>†</sup>	3,33 ± 0,24 <sup>†</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>†</sup>	35,35 ± 3,22 <sup>†</sup>
	Ret pJBpleD*	6,55 ± 0,73% <sup>†</sup>	203 ± 12 <sup>†</sup>	4,30 ± 0,42 <sup>†</sup>	0,66 ± 0,06 <sup>†</sup>	19,64 ± 3,29 <sup>†</sup>
<i>Vicia sativa</i>	Rle Tn7Km	12,31 ± 2,26% <sup>††</sup>	274 ± 18	1,12 ± 0,16 <sup>††</sup>	0,40 ± 0,09	9,52 ± 3,10
	Rle Tn7pleD*Km	23,63 ± 2,90% <sup>††</sup>	308 ± 21	0,63 ± 0,08 <sup>††</sup>	0,32 ± 0,07	5,43 ± 1,75
	Rle pJB3Tc19	8,34 ± 1,19% <sup>†</sup>	238 ± 33	0,73 ± 0,06	0,41 ± 0,09	9,93 ± 2,24
	Rle pJBpleD*	17,23 ± 2,63% <sup>†</sup>	190 ± 15	0,65 ± 0,12	0,30 ± 0,02	5,66 ± 0,40
<i>Medicago sativa</i>	Sme Tn7Km	0,35 ± 0,03 % <sup>††</sup>	73 ± 3	1,78 ± 0,10 <sup>††</sup>	0,52 ± 0,03	22,72 ± 1,67
	Sme Tn7pleD*Km	4,12 ± 0,67 % <sup>††</sup>	85 ± 10	1,38±0,10 <sup>††</sup>	0,52 ± 0,05	22,10 ± 3,13
	Sme pJB3Tc19	0,19 ± 0,08 % <sup>†</sup>	80 ± 2	1,36 ± 0,12	0,44 ± 0,07	18,74 ± 3,89
	Sme pJBpleD*	6,30 ± 1,64 % <sup>†</sup>	72 ± 6	1,80 ± 0,19	0,43 ± 0,05	20,09 ± 3,00

<sup>a</sup> Porcentaje de bacterias adheridas por gramo de raíz

<sup>b</sup> Media del número de nódulos por planta

<sup>c</sup> Media del peso de cada nódulo por planta (mg)

<sup>d</sup> Media del peso seco por planta (g)

<sup>e</sup> Contenido de nitrógeno por planta (mg)

<sup>†</sup> Diferencias significativas según un test ANOVA (P≤0.05) entre las plantas inoculadas con las cepas que portan los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19.

<sup>††</sup> Diferencias significativas según un test ANOVA (P≤0.05) entre las plantas inoculadas con las cepas Tn7pleD\*Km y Tn7Km

---

- ***Interacción Sinorhizobium meliloti 8530 - Medicago sativa cv. Aragón***

En este estudio, todas las plantas de alfalfa inoculadas con los transposantes mostraron nódulos de color rosáceo, indicativo de su efectividad fijadora. El número de nódulos formados fue similar en todas las plantas inoculadas, no afectándose por la inserción del mini-Tn7 *per se* ni por la presencia de la DGC PleD\* (Tabla 1.7). Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea ni en el contenido de nitrógeno. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los nódulos. Los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa Sme Tn7pleD\*Km eran más pequeños que los formados por la cepa control Sme Tn7Km, según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 1.7). Este hecho no se puso de manifiesto con bacterias con altos niveles de c-di-GMP portadoras del plásmido pJBpleD\*, mostrando de nuevo la mayor utilidad de los vectores mini-Tn7pleD\* para el estudio de altos niveles de c-di-GMP *in planta*.

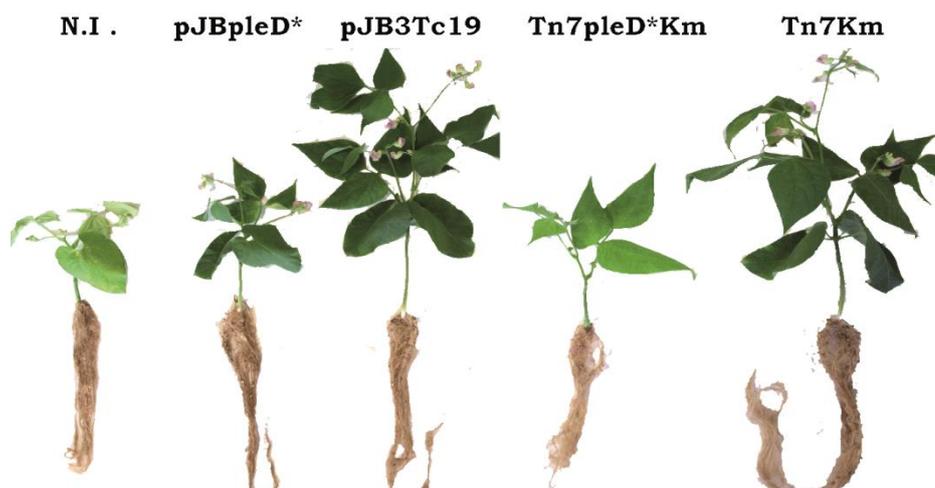
- ***Interacción Rhizobium leguminosarum bv. viciae UPM791-Vicia sativa***

Todos los nódulos de veza formados por los transposantes mini-Tn7 con y sin PleD\*, presentaban un color rosáceo indicativo de su actividad fijadora de nitrógeno. Al igual que en la interacción Sme-alfalfa, solo se observaron diferencias en el tamaño de los nódulos desarrollados por plantas inoculadas con los transposantes Rle Tn7pleD\*Km y Rle Tn7Km, siendo más grandes estos últimos (tabla 1.7). Estas diferencias, no fueron significativas con las construcciones multicopia (pJB3pleD\* vs. pJB3Tc19), lo que redundaba en la mayor estabilidad de las construcciones mini-Tn7 *in planta* en Rle (tabla 1.7).

- ***Interacción Rhizobium etli CFN42-Phaseolus vulgaris***

Esta relación simbiótica fue de nuevo la más afectada por la expresión de la DGC PleD\*. Todos los parámetros simbióticos determinados se encontraban afectados por los altos niveles de c-di-GMP provocados por la expresión de *pleD\** desde el cromosoma. En todos los casos los nódulos formados tenían una forma (esféricos) y aspecto (rosáceos) que indicaba su funcionamiento normal. No obstante, la cepa Tn7pleD\*Km formó un menor número de nódulos y de un tamaño mayor que la cepa control Tn7Km. Ambos parámetros seguían la tendencia de lo observado para la cepa con *pleD\** en

multicopia (Tabla 1.7), si bien las diferencias fueron estadísticamente más robustas cuando se usaron los transposantes mini-Tn7. Las plantas inoculadas con el transposante Ret Tn7pleD\*Km tenían un porte aéreo y un contenido en nitrógeno significativamente menores, en comparación con el obtenido por las plantas inoculadas con la cepa control Ret Tn7Km. (Fig. 1.15 y Tabla 1.7), siguiendo la misma tendencia que lo observado con la cepa Ret pJBpleD\*.



**Figura. 1.15.** Efecto de los altos niveles de c-di-GMP en la interacción *Rhizobium etli* CFN42 con *Phaseolus vulgaris*. Aspecto físico de plantas representativas de judía tras 29 días de su inoculación con las cepas de Ret indicadas, N.I., no inoculadas.

#### **1.2.10. Efecto de altos niveles de c-di-GMP en la producción de factores de Nod de *Rhizobium etli* CFN42 (Ret)**

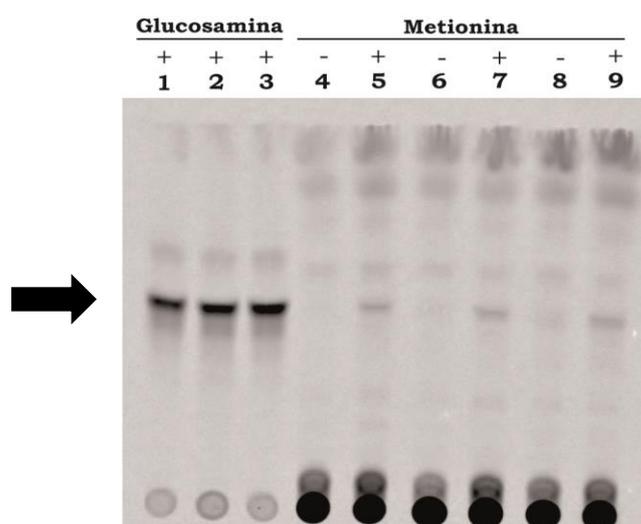
Los factores de nodulación (Nod) de Ret han sido identificados y purificados previamente (Cárdenas *et al.*, 1995). Son lipo-quitto-oligosacáridos, compuestos por 5 residuos de N-acetil-glucosamina, en cuyo extremo no reductor podemos encontrar grupos metilo, acilo y un ácido graso de 18 carbonos (C18), mientras que en el extremo reductor encontramos un residuo de O-acetil-fucosa (Cárdenas *et al.*, 1995).

Para comprobar si elevados niveles de c-di-GMP estaban provocando alteraciones tanto en la cantidad como en la composición de los factores Nod, decidimos analizar la producción de factores Nod de Ret mediante cromatografía en capa fina, ya que fue la interacción simbiótica más afectada. Con el fin de evitar la formación de flóculos y facilitar el seguimiento del crecimiento, se emplearon las cepas de Ret mini-Tn7 con y sin *pleD\** delecionadas en el operón de la celulosa ( $\Delta$ celAB, ver capítulo 2). Como

control, también se analizó la producción de factores Nods de la cepa silvestre, Ret CFN42.

Las cepas fueron crecidas en MMY con los compuestos radiactivos D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamina o L-[metil-<sup>14</sup>C]-metionina y en presencia y ausencia del flavonoide naringenina. Por problemas de disponibilidad de glucosamina marcada, en este caso las cepas solo se crecieron en presencia del inductor naringenina, sin embargo, con metionina marcada, se analizó la producción de factores Nod en presencia y ausencia del inductor naringenina. Tras un crecimiento de 30 horas, se procedió a la extracción de los compuestos marcados radiactivamente con n-butanol.

En la figura 1.16 se observan los compuestos que han incorporado la marca radiactiva. Los factores Nod se corresponden con la banda señalada por la flecha. Debido a que el esqueleto carbonado de los factores Nod de Ret están compuestos por 5 residuos de N-acetil-glucosamina, se observa una señal más intensa con este compuesto que con la metionina. Sin embargo, con ambas marcas radiactivas, no se detectaron diferencias significativas en la producción de factores Nod en presencia de altos niveles de c-di-GMP en comparación con la cepa control sin *pleD*\* y con la cepa silvestre. Estos resultados indican que, la menor eficiencia simbiótica observada en las plantas de judía inoculadas por cepas que portan la DGC PleD\*, no se debe a diferencias en la producción de factores Nod.

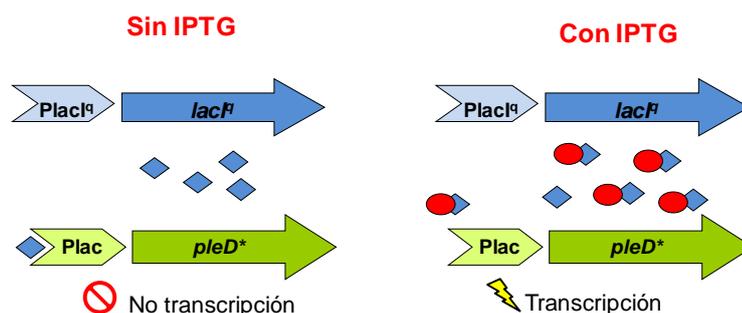


**Figura 1.16. Cromatografía en capa fina (TLC) de factores de nodulación (Nod) de *Rhizobium etli* CFN42 (Ret) en presencia y ausencia de *pleD*\***. Las cepas fueron crecidas con N-acetil-glucosamina (izquierda) y metil-metionina (derecha) marcadas radiactivamente con <sup>14</sup>C en presencia (+) y ausencia (-) de naringenina. Carriles 1, 4 y 5: Ret CFN42; carriles 2, 6 y 7: Ret ΔcelAB Tn7Km; carriles 3, 8, 9: Ret ΔcelAB Tn7pleD\*Km.

### **1.3. Construcción de un sistema modulador de la expresión de *pleD\** en las cepas mini-Tn7**

Como se ha descrito anteriormente y han observado también otros autores, la elevación artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP tiene un gran impacto en las bacterias, provocando en muchas ocasiones la expresión de rasgos o características exacerbados (Edmunds *et al.*, 2013; Huangyutitham *et al.*, 2013; Pérez-Mendoza *et al.*, 2014; Yan & Chen, 2010). Una consecuencia de esta exacerbación fenotípica son los inconvenientes para la adecuada manipulación de las bacterias, por ejemplo, la formación de flóculos debida a la sobreproducción de EPSs. En este sentido, el control de la expresión de *pleD\** en los transposantes mini-Tn7*pleD\** podría resultar muy útil para elevar los niveles de c-di-GMP de forma más controlada, en el momento adecuado y solo cuando las condiciones experimentales lo requieran.

En todas las construcciones descritas en esta tesis, el gen *pleD\** se encuentra bajo el control del promotor *lac*, por lo que sería posible controlar su expresión mediante el uso de la proteína represora LacI y un sistema modulador que incluya algún compuesto inhibidor de LacI, como el IPTG (Fig. 1.17). En nuestro caso, empleamos el gen *lacI<sup>q</sup>* por contener una mutación en su promotor que provoca una mayor expresión y producción de proteína represora LacI (Calos, 1978). El gen *lacI<sup>q</sup>* fue clonado en el vector de amplio rango de hospedador pBBR1MCS5, dando lugar al pBBR*lacI<sup>q</sup>*. De entre las distintas cepas de rizobios se escogió la cepa Sme para realizar la validación del sistema de regulación propuesto. El plásmido pBBR*lacI<sup>q</sup>* se introdujo por conjugación en la cepa Sme Tn7*pleD\**Km, en la cual se evaluó: i) la expresión relativa de *pleD\**, ii) los niveles intracelulares de c-di-GMP y iii) la producción de exopolisacáridos, todo ello en ausencia o presencia de 1mM del inductor IPTG (Tabla 1.8). La presencia de proteína LacI provoca la inhibición de la actividad de *Plac*, reprimiendo la expresión de los genes situados aguas debajo de este promotor, en nuestro caso *pleD\**. La presencia de IPTG en el medio de cultivo conlleva su unión a la proteína LacI y bloqueando su unión al promotor *lac*, permitiendo la transcripción de *pleD\** (Fig. 1.17). La cantidad de IPTG en el medio determina por tanto los niveles de expresión desde *Plac*.



**Figura 1.17. Modelo esquemático de la regulación de la expresión del gen *pleD\** a través de un sistema basado en el represor *LacI<sup>q</sup>* y el inductor IPTG.** La presencia de la proteína represora LacI (rombo azul) bloquea la expresión de *pleD\** por la unión de ésta al promotor *lac*. El inductor IPTG (círculo rojo) se une a la proteína represora, reduciendo su afinidad de unión al promotor *lac*, permitiendo por tanto la expresión de *pleD\**.

### 1.3.1. Expresión relativa de *pleD\** bajo el control del sistema *LacI<sup>q</sup>*-IPTG

La expresión relativa del gen *pleD\** se midió en la cepa *Sme Tn7pleD\*Km pBBRlacI<sup>q</sup>* en ausencia y en presencia del inductor IPTG y en la cepa control *Sme Tn7pleD\*Km pBBR1MCS5*. Los datos indicaban una fuerte represión de *pleD\** en presencia del represor *LacI<sup>q</sup>* y ausencia del inductor IPTG (Tabla 1.8). Esta represión por LacI fue aliviada, aunque solo parcialmente, por la adición de 1mM de IPTG al medio de cultivo. Estos resultados mostraban la utilidad del sistema *LacI<sup>q</sup>*-IPTG para modular la expresión de *pleD\**.

### 1.3.2. Niveles de c-di-GMP bajo el control del sistema *LacI<sup>q</sup>*-IPTG

Una vez confirmado que la expresión de *pleD\** se podía controlar mediante el sistema *LacI<sup>q</sup>*-IPTG, procedimos a cuantificar los niveles intracelulares de c-di-GMP para determinar si los niveles del dinucleótido se correlacionaban con los niveles de transcripción de *pleD\**. Como se puede observar en la Tabla 1.8, en presencia de LacI y ausencia de IPTG, los niveles de c-di-GMP fueron significativamente superiores a los de las cepas control (sin *PleD\**), lo que indica que incluso en condiciones no inductoras existe un cierto nivel de expresión de *pleD\**. La adición al medio de 1mM de IPTG provocó un aumento de 3 veces en la cantidad de c-di-GMP en la cepa *Sme Tn7pleD\*Km pBBRlacI<sup>q</sup>*. En consonancia con la expresión de *pleD\**, la presencia de 1 mM de IPTG no fue suficiente para que se alcanzaran los niveles de c-di-GMP de la cepa sin LacI, *Sme Tn7pleD\*Km pBBR1MCS5*.

**Tabla 1.8. Eficacia del sistema LacI<sup>q</sup>-IPTG en la modulación de *pleD*\***

Cepa	Expresión relativa de <i>pleD</i> * <sup>1</sup>		Niveles intracelulares de c-di-GMP <sup>2</sup>		Formación de exopolisacáridos <sup>3</sup>	
	IPTG -	IPTG +	IPTG -	IPTG +	IPTG -	IPTG +
<b>Sme Tn7<i>pleD</i>*Km pBBR1MCS5</b>	15,1 ± 1,9	n.d.	317,2 ± 13,3	n.d.	2,7x10 <sup>6</sup> ± 6,9x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>6</sup> ± 7,3x10 <sup>4</sup>
<b>Sme Tn7<i>pleD</i>*Km pBBRlacI<sup>q</sup></b>	1,0 ± 0,26	6,08 ± 1,06	55,1 ± 16,3	152,05 ± 8,5	3,5x10 <sup>5</sup> ± 1,1x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>6</sup> ± 6,4x10 <sup>4</sup>
<b>Sme Tn7Km</b>	-	-	-	n.d.	6,2x10 <sup>4</sup> ± 5,5x10 <sup>3</sup>	7,4x10 <sup>4</sup> ± 3,4x10 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Expresión relativa del gen *pleD*\* con respecto a la cepa Sme Tn7*pleD*\*Km pBBRlacI<sup>q</sup> mediante qRT-PCR. Los datos de expresión están normalizados con los del ARNr 16S. n.d., no determinado

<sup>2</sup> Cantidad de c-di-GMP de las cepas indicadas. Valores expresados en pmol/mg proteína. Los niveles de la cepa Sme Tn7Km se encontraban bajo el límite de detección de la técnica.

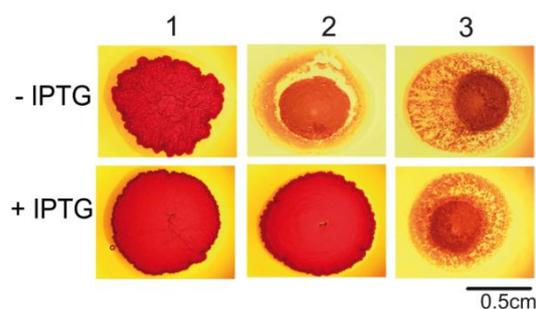
<sup>3</sup> Cuantificación de EPSs por medida de la fluorescencia en medio con calcoflúor (unidades arbitrarias)

### 1.3.3. Producción de exopolisacáridos bajo el control del sistema *LacI<sup>q</sup>-IPTG*

A continuación se evaluó si la modulación de los niveles de c-di-GMP permitía una modulación de los fenotipos dependientes de este segundo mensajero. De entre ellos, se decidió estudiar la producción de EPS por ser, tal y como se ha expuesto anteriormente, uno de los fenotipos exacerbados que más inconvenientes generan.

En la Tabla 1.8 se recoge la fluorescencia medida en cultivos de 48 h en MM líquido con CF. Al igual que sucedía con la expresión de *pleD\** y los niveles de c-di-GMP, en ausencia del inductor la cepa *Sme Tn7pleD\*Km pBBRlacI<sup>q</sup>* presentó una menor fluorescencia, y por tanto menor producción de EPSs, que la cepa carente de represor (*Sme Tn7pleD\*Km pBBRMCS5*). La adición de 1mM de IPTG provocó un significativo aumento de la producción de EPS, que fue además, similar a la cepa portadora del vector vacío (*Sme Tn7pleD\*Km pBBR1MCS5*). De igual forma, esta cantidad de IPTG fue suficiente para que las colonias mostrasen aspecto rugoso y color rojo sobre medio sólido adicionado de CR (Fig. 1.18).

Tomando todos estos datos de transcripción de *pleD\**, contenido intracelular de c-di-GMP y producción de EPSs, podemos afirmar que el sistema *LacI<sup>q</sup>-IPTG* podría resultar útil para modular los niveles de c-di-GMP en ciertas condiciones. En ausencia del inductor se inhibe fuertemente la expresión de *pleD\**, aunque no se consigue una represión completa por *LacI*; tampoco se observó la desrepresión completa por la adición de 1 mM de IPTG. Sin embargo, ambas situaciones demuestran que es posible obtener niveles de c-di-GMP intermedios y suficientes para desencadenar los fenotipos esperados.



**Figura 1.18. Regulación en la producción de exopolisacáridos mediante el sistema inductor *pleD\** *LacI<sup>q</sup>-IPTG*.** Morfología de las colonias de *Sme Tn7pleD\*Km pBBR1MCS5* (1), *Sme Tn7pleD\*Km pBBRlacI<sup>q</sup>* (2), y *Sme Tn7Km* (3), tras 48 horas de incubación en medio mínimo con CR (125  $\mu$ g/ml), en ausencia y presencia de IPTG 1 mM.

## **DISCUSIÓN CAPITULO I**

El c-di-GMP ha emergido en los últimos años como un segundo mensajero clave en la transición entre los estilos de vida móvil y sedentario de las bacterias (Römling *et al.*, 2013). Las bacterias que interactúan con plantas, y en especial las bacterias conocidas como rizobios, sufren un espectacular cambio en su modo de vida al entrar en contacto con el hospedador. Estas bacterias deben de pasar de vivir de forma saprófita y libre en la rizosfera, a un modo de vida en el interior de células vegetales como bacteroides fijadores de N<sub>2</sub> (Gage, 2004).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que los genomas de bacterias que interactúan con plantas codifican para un gran número de proteínas que metabolizan el c-di-GMP (DGC y PDE), llegando a presentar en algunas especies más de 40 de estas proteínas (Prada-Ramírez, 2014). El elevado número de DGC y PDE, junto con las numerosas funciones bacterianas controladas por este segundo mensajero, como motilidad, producción de EPS o formación de biopelículas, sugieren que el c-di-GMP puede jugar un papel destacable en la transición hacia un estilo de vida en íntimo contacto con la planta hospedadora.

Sin embargo, la existencia de numerosas DGC y PDE en los genomas de estas bacterias, dificulta un abordaje genético clásico. Por ello, en esta tesis se ha seguido una estrategia alternativa, consistente en el incremento generalizado de los niveles intracelulares de c-di-GMP, mediante la sobreexpresión de la DGC heteróloga PleD\* desde el plásmido pJBpleD\* y el estudio de su impacto sobre el comportamiento de diferentes bacterias, tanto simbióticas como patógenas de plantas. Como representantes de bacterias simbióticas elegimos las cepas modelo *S. meliloti* 8530, *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 y *R. etli* CFN42, mientras que como representante de bacteria que establece una relación patogénica con plantas, se ha utilizado *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

En las cuatro bacterias de estudio, la sobreexpresión de PleD\* incrementó de forma sustancial los niveles intracelulares de c-di-GMP, produciendo fenotipos análogos a los observados en otras bacterias tras sobreexpresar una DGC: disminución de la motilidad, incremento de la producción de EPS, cambios en la morfología de las colonias, incrementos de la floculación y de la formación de biopelículas (Barnhart *et al.*, 2013; Pérez-Mendoza *et al.*, 2011b; Simm *et al.*, 2004; Tagliabue *et al.*, 2010):

Las cuatro especies bacterianas analizadas mostraron una reducción de la motilidad tipo *swimming*, así como de la motilidad en superficie o tipo *swarming*, ambas dependientes de flagelos. En otras bacterias, el c-di-GMP inhibe la motilidad bacteriana a nivel transcripcional a través de su unión con reguladores transcripcionales de los genes flagelares (Baraquet & Harwood, 2013; Pesavento *et al.*, 2008); sin embargo, el mayor efecto inhibitorio del c-di-GMP tiene lugar a nivel posttraduccional, como se ha demostrado en enterobacterias, a través de YcgR, (Boehm *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2010; Ryjenkov *et al.*, 2006). Recientemente, en *Sme* 2011 se ha descrito la proteína McrA, con una función equivalente a YcgR (Schäper *et al.*, 2016). Esta proteína se encuentra muy conservada en los rizobios, lo que sugiere que en este grupo bacteriano existe un mecanismo de regulación de la motilidad similar al descrito en enterobacterias.

En cuanto a la producción de EPS, todas las especies analizadas mostraron un fenotipo CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup> al sobreexpresar la DGC PleD\*. Sin embargo, aquí encontramos diferencias en cuanto a la naturaleza de los EPS producidos. Ret, Rle y Pto, poseen un operón para la biosíntesis de la celulosa, uno de los EPS en los que se ha demostrado que el c-di-GMP ejerce un papel regulador, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional en diferentes bacterias (Fang *et al.*, 2014; Garcia *et al.*, 2004; Römling, 2002). *Sme* no posee un operón para la síntesis de celulosa, aunque en respuesta a altos niveles de c-di-GMP es capaz de producir un EPS lineal conocido como glucano de enlaces mixtos (MLG), formado por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-4) y  $\beta$  (1-3) alternantes, (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). En estas condiciones, el MLG es el responsable de los fenotipos sobre CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup> de *Sme*, ya que mutantes en los genes *bgsBA*, responsables de la producción de este EPS, presentan un comportamiento similar a la cepa con niveles fisiológicos de c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). En el fitopatógeno Pto, la celulosa es la principal responsable de los fenotipos CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup>, puesto que mutantes en los genes *wss*, encargados de la biosíntesis de celulosa en esta bacteria, muestran fenotipos CR<sup>-</sup> y CF<sup>-</sup>, aun cuando los niveles de c-di-GMP sean elevados (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Una situación más compleja la encontramos en los rizobios Ret y Rle portadores de los genes de biosíntesis para ambos EPS y donde al menos en el caso de Ret, tanto celulosa como MLG contribuyen a los fenotipos CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup> al sobreexpresar la DGC PleD\* (ver capítulo 2). Precisamente Rle

y Ret forman biopelículas densas y compactas sobre superficies abióticas al sobreexpresar *pleD\**, mientras que Sme y Pto forman una biopelícula en la interfase aire-líquido, indicando una fuerte adhesión célula-célula pero una adhesión débil a la superficie abiótica sobre la que crecen las bacterias.

En la interacción rizobio-leguminosa, el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP, provoca efectos diferentes dependiendo del sistema y de la etapa simbiótica en cuestión. Así por ejemplo, la expresión de *pleD\** en Ret, Rle y Sme incrementa significativamente la adhesión de estas bacterias a las raíces de judía, veza y alfalfa respectivamente, probablemente como resultado de la producción incrementada de EPS. La mayor adhesión a raíces por sobreproducción de diferentes EPS ha sido previamente demostrada en numerosas bacterias (Matthysse *et al.*, 2005; Pérez-Mendoza *et al.*, 2015; Smit *et al.*, 1992). Sin embargo, son muchos los EPS y otros biopolímeros que están regulados por este segundo mensajero (Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016), por lo que no podemos descartar la acción de otras macromoléculas producidas por los rizobios y que también estén influyendo en etapas iniciales de adhesión, como el glucomanano o las proteínas Rap (Ausmees *et al.*, 2001a; Mongiardini *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008).

Además, nuestros resultados revelaron importantes efectos del diguanilato cíclico en etapas posteriores de la interacción simbiótica. Elevados niveles de c-di-GMP reducen de forma significativa la eficiencia simbiótica, sobre todo en el sistema Ret-judía. En este caso, el porte aéreo, el número de nódulos y el contenido en nitrógeno se encontraban reducidos en aquellas plantas inoculadas con la cepa Ret pJBpleD\*. Los sistemas simbióticos Rle-veza y Sme-alfalfa no se encontraron gravemente afectados por elevados niveles de c-di-GMP en los parámetros determinados, sugiriendo que este segundo mensajero podría ejercer diferentes efectos dependiendo del tipo de simbiosis, con formación de nódulos determinados (Ret-judía) o indeterminados (Rle-veza y Sme-alfalfa). Sin embargo, los nódulos de las tres interacciones analizadas, contenían pocas o ninguna bacterias portadoras de la construcción pJBpleD\*, lo que sugiere una fuerte presión de los elevados niveles de c-di-GMP contra el adecuado progreso de la interacción, de forma que la correcta progresión de la simbiosis establecida por las cepas portadoras de *pleD\** exigiría la pérdida del plásmido pJBpleD\* de la mayor parte de la población bacteriana del nódulo. La pérdida del vector pJBpleD\* también pudo observarse en algunas condiciones de vida libre. La baja estabilidad en ausencia de la

---

presión selectiva de antibióticos y el efecto multicopia, son dos de los inconvenientes presentados por los vectores de expresión. Por ello, nos decidimos a construir una serie de herramientas genéticas para la introducción estable del gen *pleD\** en el genoma de distintas bacterias que interaccionan con plantas.

De todos los sistemas para la integración estable de genes en los genomas bacterianos, nos decantamos por el empleo de los vectores mini-Tn7 basados en las propiedades del transposón Tn7. Este se inserta con una elevada frecuencia en una región intergénica muy conservada en numerosas bacterias Gram negativas, sin afectar a la viabilidad celular (Barnes *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2006; Choi & Schweizer, 2006a; Choi & Schweizer, 2006b). Varios vectores basados en el transposón Tn7 se ha empleado con éxito en diferentes especies bacterianas para la integración estable de distintos genes de interés (Jittawuttipoka *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Lambertsen *et al.*, 2004), convirtiendo los vectores mini-Tn7 en una potente herramienta en estudios ambientales o *in vivo* donde la continua selección con antibiótico no es posible.

Se construyeron varios vectores derivados de mini-Tn7 portadores del *pleD\**, bien solo o acompañado de genes de resistencia antibióticos. La eficiencia de inserción varió dependiendo de la cepa receptora y del gen de resistencia acompañante, aunque se demostró la utilidad de todos ellos en las cuatro bacterias modelo utilizadas en esta tesis. Aunque en general se obtuvieron eficiencias de inserción bajas, la alta especificidad de inserción de este transposón determina que este parámetro no sea trascendental, salvo quizá en bacterias que contienen más de un sitio de inserción en el genoma. En bacterias como *Sme*, que posee sitios *attTn7* asociados a *glmS* y *nodM*, parece existir una preferencia del transposón por el sitio *nodM* respecto al sitio *glmS*, algo que ya han observado otros autores anteriormente (Bolton *et al.*, 1984). En este caso encontramos cierta dificultad para identificar transposantes asociados al gen *glmS*, los cuales, al contrario de *nodM*, no se encuentran afectados en propiedades importantes como la interacción con la leguminosa hospedadora.

A pesar de que existen numerosos trabajos que describen la estabilidad de las inserciones mini-Tn7 en diferentes bacterias (Barnes *et al.*, 2008; Crepin *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2005; McKenzie & Craig, 2006), comprobamos la estabilidad de nuestras construcciones en las cuatro bacterias de estudio, en condiciones de ausencia de antibióticos. Pudimos concluir que en todas las especies, las inserciones mini-Tn7 son

100% estables al menos durante 100 generaciones en medios de cultivo habituales. Esto contrasta con la baja estabilidad del plásmido pJBpleD\*, sobre todo en Ret, que tiende a perderse rápidamente de la población cuando las bacterias son cultivadas en ausencia de antibióticos selectivos.

También se comprobó la funcionalidad de las inserciones mini-Tn7pleD\* mediante la cuantificación de los niveles de c-di-GMP y su efecto sobre varias propiedades bacterianas (motilidad, producción de EPS y formación de biopelículas). A pesar de que el gen *pleD\** se encuentra en monocopia dentro del genoma de los transposantes, provocó incrementos de los niveles de c-di-GMP similares y en algunos casos mayores que el plásmido pJBpleD\*. Esto podría explicarse por la mayor estabilidad de las inserciones mini-Tn7 y por la presión negativa producida por el efecto multicopia del vector pJBpleD\*. Se encontraron diferentes contenidos de c-di-GMP entre los transposantes Km y Tc de Pto, que determinaron también ligeras diferencias fenotípicas. Estas discrepancias fueron probablemente debidas a distintos niveles de expresión del gen *pleD\**, como se pudo comprobar mediante RT-PCR. Se desconocen las razones de estas diferencias, aunque estos datos indican que puede ser necesario obtener y analizar distintos transposantes hasta identificar aquellos con niveles de expresión más adecuados.

Tanto la motilidad *swimming* como *swarming* se vieron drásticamente reducidas en los transposantes mini-Tn7pleD\* en comparación con las cepas control, no encontrándose diferencias entre los transposantes mini-Tn7 y las cepas portadoras del plásmido pJBpleD\*. También la expresión de *pleD\** integrado en el cromosoma dio lugar a colonias rugosas con una coloración roja intensa en medios con CR, y con fluorescencia azul brillante sobre CF, similar a lo observado para las cepas que portan el vector pJBpleD\*. Esto ocurrió en todos los transposantes excepto para el transposante Pto Tn7pleD\*Km, que presentaba un aspecto similar a la cepa silvestre, en concordancia con los menores contenidos de c-di-GMP de esta cepa.

Una consecuencia del incremento de la producción de EPS por altos niveles de c-di-GMP es la mayor capacidad de formación de biopelículas. Los transposantes mini-Tn7pleD\* de Rle y Ret formaban biopelículas similares o incluso superiores a las obtenidas por las cepas portadoras del plásmido pJBpleD\*, poniéndose de nuevo de

---

manifiesto la idoneidad de las construcciones mini-Tn7 para el incremento artificial de los niveles intracelulares de c-di-GMP.

Además, se analizó la interacción con la planta y el comportamiento simbiótico de los transposantes mini-Tn7 de las tres especies de rizobios Sme, Rle y Ret. En primer lugar, se evaluó la adhesión a raíces de veza y judía de los transposantes Tn7pleD\*Km de Rle y Ret respectivamente, mostrando que la expresión de *pleD\** en monocopia genera un incremento de la capacidad de adhesión a las raíces de sus respectivas plantas hospedadoras, fenotipo similar al observado para las cepas que portan *pleD\** en multicopia. En cuanto al comportamiento simbiótico, los transposantes Tn7pleD\*Km de Sme y Rle presentaron diferencias significativas en el peso de los nódulos en comparación con la cepa control Tn7Km. Estas diferencias no fueron registradas por sus correspondientes versiones portando los plásmidos pJBpleD\* y pJB3Tc19. En la interacción Ret-judía, el comportamiento de los transposantes fue similar al mostrado por la cepa portadora del plásmido pJBpleD\*, observándose una reducción de la eficiencia simbiótica, con un menor número de nódulos, menor porte aéreo y una reducción significativa del contenido de nitrógeno en comparación con las cepas control carentes de PleD\*. Sin embargo, la mayor estabilidad de las inserciones mini-Tn7 acentuó las diferencias en todos los parámetros analizados. También se determinó la estabilidad de las inserciones mini-Tn7 *in planta*. Entre un 90 y un 100% de los nódulos seguían manteniendo el transposón mini-Tn7pleD\*Km, en contraste con la baja permanencia de los plásmidos, especialmente la de pJBpleD\* en Ret (0%). No obstante, la estabilidad de las inserciones mini-Tn7pleD\*Km en Sme y Ret parece ser ligeramente menor *in planta* (90%) en comparación con la estabilidad en vida libre (100%), lo cual sugiere que para el normal desarrollo de la simbiosis existe una presión contra aquellas bacterias que presentan unos niveles anormalmente elevados de c-di-GMP.

La sobreexpresión de una DGC, provoca un gran impacto en determinados fenotipos, que en ocasiones pueden suponer un gasto metabólico muy elevado (Edmunds *et al.*, 2013; Simm *et al.*, 2004). Este impacto no siempre es evidente, y por ejemplo no se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento de las bacterias con altos niveles de c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Con el fin de modular los niveles de c-di-GMP a demanda, se ha diseñado un sistema de regulación de la expresión de *pleD\** una vez integrado en el genoma. Puesto que *pleD\** se encuentra

bajo el promotor *Plac*, se ha hecho uso del sistema represor/antirrepresor *lacI<sup>q</sup>/IPTG*. Mediante la cuantificación de la expresión relativa de *pleD\** y los niveles intracelulares de c-di-GMP en ausencia o presencia de 1mM de IPTG, pudimos determinar que el sistema *lacI<sup>q</sup>/IPTG* permite controlar la expresión de *pleD\** y, en concordancia, modular los niveles intracelulares de c-di-GMP. A pesar de que la adición de 1 mM de IPTG no desreprime totalmente la expresión de *pleD\** en presencia de *LacI<sup>q</sup>*, los niveles intracelulares de c-di-GMP generados son suficientes para la observación de fenotipos asociados a elevados niveles de c-di-GMP, como la producción de EPS (Fig. 1.17 y tabla 1.8). El sistema *lacI<sup>q</sup>/IPTG* nos permitirá controlar la expresión de *pleD\** cuando se den las condiciones adecuadas. Por ejemplo, en ensayos *in planta*, *pleD\** podría estar parcialmente reprimido en presencia de *lacI<sup>q</sup>* y ausencia de IPTG. Una vez establecida la simbiosis la simple adición de IPTG a la solución nutritiva donde se encuentran las raíces podría permitir la expresión de *pleD\**. De esta forma podríamos realizar un estudio del efecto de elevados niveles de c-di-GMP en cada una de las etapas del proceso simbiótico y observar cuál de ellas se encuentra más afectada. En las interacciones *Ret-P. vulgaris* y *Sme-M. sativa*, el empleo de IPTG para la inducción artificial de genes durante la nodulación, no tiene ningún efecto negativo en el establecimiento de dichas simbiosis. El IPTG añadido a las raíces es capaz de atravesar todas las membranas biológicas y una vez en el citoplasma bacteriano inducir la expresión de los genes de interés (Box & Noel, 2011). Sin embargo, uno de los principales inconvenientes del empleo del IPTG *in planta* es el elevado coste económico que supondría.

En resumen, altos niveles de c-di-GMP provocan efectos diferentes según la etapa simbiótica analizada. Por un lado, se favorecen las etapas tempranas de la interacción con la planta, como la adhesión a raíces, mientras que por otro lado los elevados niveles de este segundo mensajero provocan una reducción en la eficiencia simbiótica, especialmente en aquellas plantas formadoras de nódulos determinados. La construcción de vectores mini-Tn7 nos permitió expresar de forma estable el gen *pleD\**, convirtiendo estos vectores en mejores herramientas para la elevación de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Además, el uso del sistema *lacI<sup>q</sup>/IPTG* para la modulación de la expresión de *pleD\**, permite alterar el contenido de c-di-GMP a demanda.

## **ANEXOS CAPÍTULO I**

### **1.1. Construcción de vectores mini-Tn7 portadores del gen *pleD*\***

Para la amplificación del gen *pleD*\* desde el vector de expresión pJB*pleD*\* se utilizó la siguiente pareja de oligonucleótidos:

pJB3Tc19-F GCCTCTTCGCTATTACGCC  
pleDTn7 GAGCTCACGCAAACCGCCTCTCC

### **1.2. Comprobación de las inserciones mini-Tn7 mediante PCR**

Las inserciones mini-Tn7 se comprobaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando una pareja de oligonucleótidos específica para cada especie, flanqueando al sitio *attTn7* que se encuentra bajo el gen *glmS*. Con estos oligonucleótidos se produce un amplicón en la cepa silvestre pero no en los transposantes. Puesto que la orientación del transposón Tn7 tras su inserción es conocida, utilizando un oligonucleótido interno del Tn7, pTn7R y los oligonucleótidos F para cada especie, se pudo comprobar la presencia del transposón aguas abajo del gen *glmS*. En el caso de *S. meliloti* se diseñó otro oligonucleótido, Rm\_NodM, que hibrida aguas abajo del gen *nodM*, para poder identificar aquellas inserciones asociadas a este gen.

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Usado en</b>
pTn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	Verificación de la inserción bajo <i>glmS</i> . Oligonucleótidos internos del transposón Tn7
pTn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTTC	
<i>glmS</i> 1etF	CCTGTTATCGTCATTGCTCC	Verificación de la inserción en Ret bajo <i>glmS</i> 1
<i>glmS</i> 1etR	CGACAGCAATCAGCAGGC	
<i>glmS</i> _pstF	TGGCGAACTCAAACACGG	Verificación de la inserción en Pto bajo <i>glmS</i>
<i>glmS</i> _pstR	TACCGAGTAGAACCTCCTTAGC	
<i>glmS</i> _legF	CCTGTCATCGTCATCGCC	Verificación de la inserción en Rle bajo <i>glmS</i>
<i>glmS</i> _legR	GCACGACGGCGATCAGC	
<i>glmS</i> _rmF	CCACGCCGAAGGTTACG	Verificación de la inserción en Sme bajo <i>glmS</i>
<i>glmS</i> _rmR	AGGCTCGTTGCGGAACC	
Rm_NodM	GCGAGGTCAGTGTAAGC	Verificación de la inserción en Sme bajo <i>nodM</i>

### **1.3. Expresión de *pleD*\* mediante RT-PCR**

Para los estudios de expresión del gen *pleD*\* en Pto, se emplearon las siguientes parejas de oligonucleótidos:

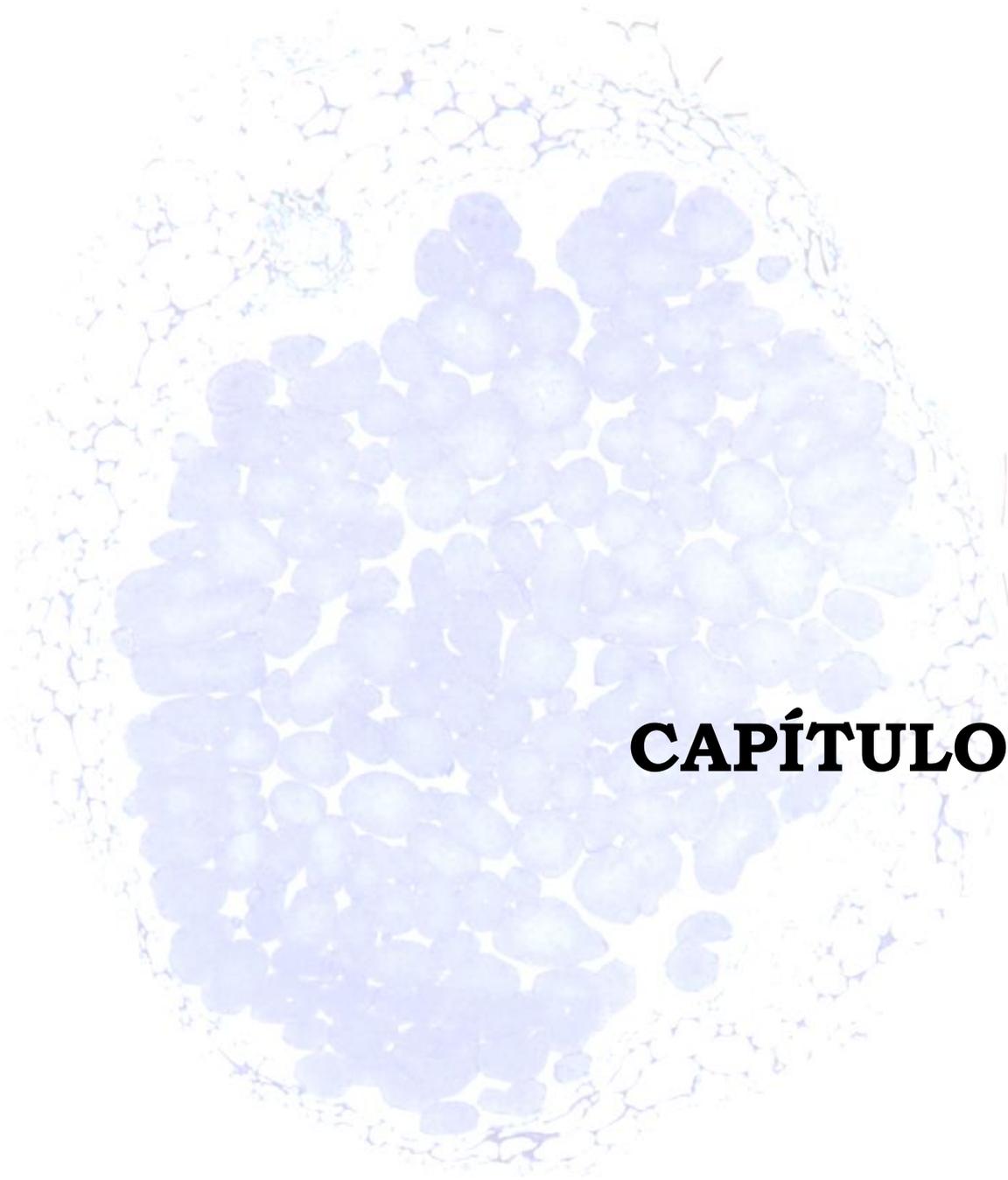
RT_pleDF	AATGTCCGCCTGCTTGA
RT_pleDR	CAGAATGATGTCGGGCAG
F-RT-16S	ACACCGCCCGTCACACCA
R-RT-16S	GTTCCCCTACGGCTACCTT

Para los estudios de expresión del gen *pleD*\* en Sme, se emplearon las siguientes parejas de oligonucleótidos:

RT_pleDF	AATGTCCGCCTGCTTGA
RT_pleDR	CAGAATGATGTCGGGCAG
Rm 16S F	TCTACGGAATAACGCAGG
Rm 16S R	GTGTCTCAGTCCCAATGT

### **1.4. Construcción del vector pBBRlacI<sup>q</sup>**

El gen *lacI*<sup>q</sup> fue extraído mediante digestión con la enzima *McsI* del plásmido pQE-80L (Qiagen). El fragmento de 1610 pb se clonó en el vector pBBR1MCS5 previamente digerido con la enzima *SmaI*. El plásmido resultante, pBBRlacI<sup>q</sup>, fue introducido en la cepa movilizadora  $\beta$ 2163 para posteriormente movilizarlo mediante conjugación biparental al transposante Sme Tn7*pleD*\*Km.



## **CAPÍTULO II**



---

## **2. Papel de la celulosa y glucano de enlaces mixtos (MLG) en *Rhizobium etli* CFN42: formación de biopelículas e interacción con su hospedador**

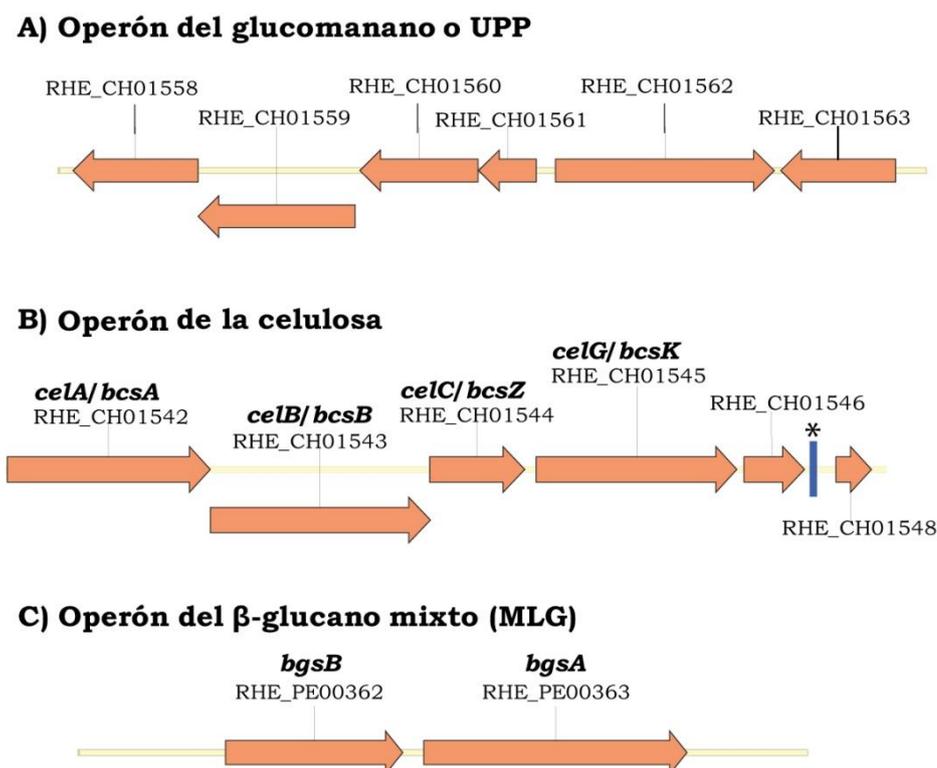
En el capítulo anterior se han descrito los efectos provocados por la sobreexpresión de la DGC PleD\* en diferentes bacterias que interaccionan con plantas, tanto patogénicas como simbióticas. En vida libre, el incremento artificial de los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP produce una drástica inhibición de la motilidad en todas las bacterias ensayadas, un aumento en la producción de exopolisacáridos y como consecuencia, una mayor floculación y formación de biopelículas sobre superficies abióticas. En cuanto a la interacción con la planta, los resultados más interesantes se observaron en la interacción simbiótica rizobio-leguminosas, en donde los elevados niveles intracelulares de c-di-GMP de la bacteria parecen tener un doble efecto: por un lado afectan positivamente a etapas tempranas de la interacción, como la adhesión de los rizobios a las raíces de las plantas hospedadoras; por el otro, parecen perjudicar etapas posteriores, afectando negativamente la eficiencia simbiótica. Dentro de las estudiadas, la interacción simbiótica más afectada fue la de *R. etli* CFN42 (Ret) con su hospedador *P. vulgaris* (judía), lo que nos animó a realizar un estudio más profundo de esta interacción.

Los exopolisacáridos (EPS) secretados por los rizobios juegan un papel clave en la colonización de la raíz y en el correcto desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno (Laus *et al.*, 2005; Rinaudi & Gonzalez, 2009). Tal y como se describió en el capítulo I, la producción de EPS fue uno de los fenotipos más alterados en Ret en respuesta a la sobreexpresión de la DGC PleD\*. Además, los EPS juegan un papel muy importante en el establecimiento de la simbiosis (Fraysse *et al.*, 2003; Laus *et al.*, 2005; Leigh & Walker, 1994; Pellock *et al.*, 2002; Skorupska *et al.*, 2006). Por tanto, es razonable pensar que estos EPS estén relacionados con las alteraciones simbióticas exhibidas por las cepas bacterianas que sobreexpresan la DGC PleD\*.

### **2.1. Exopolisacáridos regulados por c-di-GMP en *Rhizobium etli* CFN42 (Ret)**

Como se ha descrito en la Introducción de esta tesis doctoral, Ret puede producir varios tipos de polisacáridos, incluyendo polisacáridos capsulares (CPS), el

lipopolisacárido (LPS), los  $\beta$ -glucanos cíclicos periplásmicos, así como otros secretados al medio como son el EPS ácido, la celulosa, el  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG) o el glucomanano (UPP). De todos ellos, encontramos que la producción de celulosa, MLG y UPP está regulada por el segundo mensajero c-di-GMP en otras bacterias filogenéticamente relacionadas (Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016).



**Figura 2.1.** Esquema de la organización genética de algunos operones para la biosíntesis de exopolisacáridos en *R. etli* CFN42 (Ret), que están regulados por c-di-GMP en otras bacterias. A) Síntesis de glucomanano o polisacárido unipolar (UPP), B) síntesis de celulosa y C)  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG). \* ORF perteneciente a RHE\_CH01547, el cual codifica para un ARNt.

### 2.1.1 Polisacárido unipolar (UPP) o glucomanano.

Este EPS ha sido previamente descrito en diferentes miembros de la familia *Rhizobiaceae*, como *R. leguminosarum* (Rle), *S. meliloti* 2011 (Sme 2011) y *A. tumefaciens* (Atu). Sin embargo, la regulación del UPP por altos niveles de c-di-GMP solo está descrita en los dos últimos casos (Schäper *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2013).

Los genes RHE\_CH01558 al RHE\_CH01563 del genoma de Ret presentan una organización idéntica a la de los genes *upp*ABCDEF de Rle, Sme 2011 y Atu, así como

alta conservación de secuencias, superior al 60% (Fig. 2.1A). El primer gen del operón, RHE\_CH01558, codifica para una proteína hipotética con un dominio Wzy, el segundo y tercer gen codifican para sendas glicosiltransferasas, mientras que los productos de los genes RHE\_CH01561 y RHE\_CH01562 serían los encargados de la exportación de este polisacárido unipolar. Finalmente, RHE\_CH01563 codifica para una acetiltransferasa.

Desde el punto de vista de la interacción con la planta, en Rle el glucomanano es necesario para la adhesión a raíces de veza y para una infección competitiva (Williams *et al.*, 2008). En Sme 2011, el UPP es el responsable de la formación de biopelículas en respuesta a elevados niveles de c-di-GMP (Schäper *et al.*, 2016), mientras que en el patógeno de plantas *A. tumefaciens*, el UPP es requerido para la adhesión polar de esta bacteria al entrar en contacto con una superficie (Xu *et al.*, 2013).

Debido a que la regulación por c-di-GMP del UPP ha sido recientemente publicada, el estudio de este EPS en Ret no fue incluido entre los objetivos de esta tesis doctoral, por lo que no se ha profundizado en el estudio de su función.

### 2.1.2 Celulosa

La celulosa es uno de los mayores componentes de las biopelículas bacterianas y desempeña un papel clave en las interacciones célula-célula y célula-superficie (Römling, 2002; Ross *et al.*, 1991). La producción de celulosa en Rle y Atu está documentada previamente y se han identificado los genes responsables de su producción (Ausmees *et al.*, 1999; Matthyse, 1983; Matthyse *et al.*, 1995; Napoli *et al.*, 1975). En Atu la biosíntesis de celulosa corre a cargo de dos operones convergentes *celABCG* (también conocidos como *bcsABZK*) y *celDE* (*bcsLM*) (Matthyse *et al.*, 1995). Rle posee el operón *celABCG*, mientras que el gen *celD* se encuentra aislado en una localización distante del genoma (Ausmees *et al.*, 1999) y *celE* está ausente. La organización de los genes de biosíntesis de celulosa en Ret, difiere de las dos bacterias anteriormente mencionadas, ya que solo posee los genes *celABCG* mientras que el operón divergente *celDE* parece ausente del genoma de esta bacteria (Fig. 2.1B).

La actividad de la celulosa sintasa CelsA está regulada a través de la unión del c-di-GMP a su dominio PilZ (Morgan *et al.*, 2014). De esta forma la sobreexpresión de alguna DGC eleva los niveles intracelulares de este segundo mensajero desencadenando un aumento de la producción de celulosa (Barnhart *et al.*, 2014; Pérez-Mendoza *et al.*,

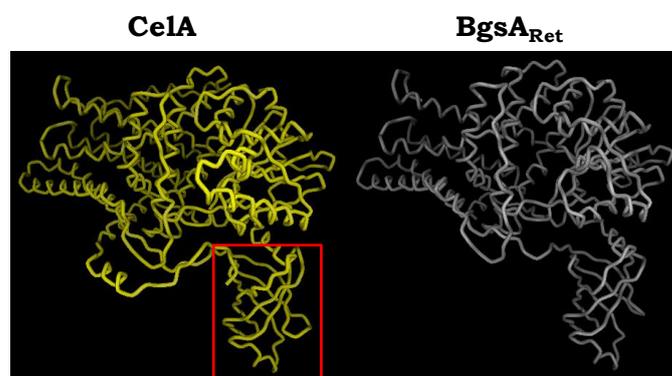
2014; Römling, 2002). Debido a la importancia de este EPS en Atu y Rle para la adhesión y formación de biopelículas sobre plantas hospedadoras, decidimos profundizar en el conocimiento de la celulosa en Ret y en su interacción con judía. Para ello realizamos un abordaje genético mediante la construcción de mutantes carentes de los genes *celAB*, que codifican para las subunidades catalíticas de la celulosa sintasa (ver apartado 2.2).

### 2.1.3 $\beta$ -glucano de enlaces mixtos (MLG)

Finalmente, en el genoma de Ret también encontramos los genes necesarios para la síntesis del polisacárido recientemente descubierto en *S. meliloti* 8530 (Sme),  $\beta$ -glucano de enlaces mixtos o MLG (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015) (Fig. 2.1C). Los genes RHE\_PE00362 y RHE\_PE00363 de Ret son homólogos a los genes *bgsBA* de Sme. RHE\_PE00362 codifica para una hipotética proteína de membrana que presenta una identidad del 67% con BgsB de Sme. Dicha proteína posee un dominio HlyD, por lo que podría estar implicada en el transporte del MLG al exterior celular. El gen RHE\_PE00363 codifica para una glicosiltransferasa encargada de transferir los residuos glucosídicos a la cadena polisacáridica creciente. Esta glicosiltransferasa presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 80% con BgsA de Sme. Mediante el empleo del software Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) para la predicción de la estructura terciaria de proteínas pudimos comprobar que la estructura terciaria de la proteína BgsA de Ret ( $BgsA_{Ret}$ ) es muy semejante a la estructura terciaria de CelA, la subunidad A de la celulosa sintasa de Ret (Fig. 2.2). No obstante, es necesario aclarar que en Phyre2 las estructuras de proteínas usadas como modelo condicionan muy significativamente el resultado del análisis comparativo. En este caso, las estructuras de las glicosiltransferasas CelA y BgsA de Ret están basadas en la estructura de la celulosa sintasa BcsA de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 4HG6) (Morgan *et al.*, 2013).

En relación a su activación por c-di-GMP, cabe resaltar la similitud entre la modelización obtenida del dominio C-terminal de  $BgsA_{Ret}$  y la estructura del dominio PilZ de CelA (Fig. 2.2, recuadro rojo). En Sme este dominio C-terminal citoplasmático de BgsA está implicado en la unión específica del segundo mensajero c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). A pesar de esta aparente homología estructural, el extremo C-terminal de  $BgsA_{Ret}$  no puede considerarse un dominio PilZ pues, al igual que  $BgsA_{Sme}$ ,

no presenta las secuencias consenso descritas para dominios PilZ (Amikam & Galperin, 2006; Ryjenkov *et al.*, 2006).

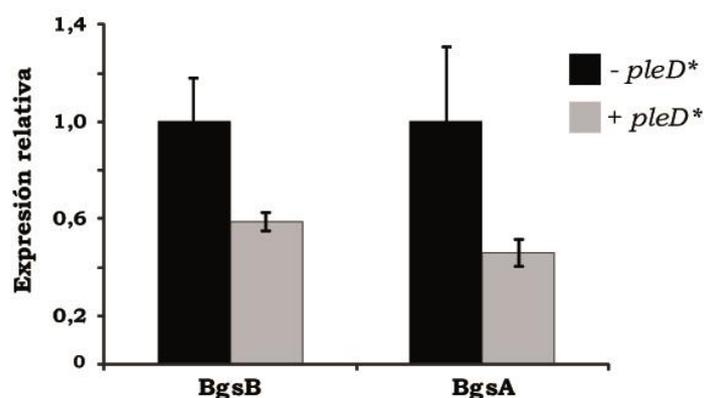


**Figura 2.2.** Comparación de la estructura terciaria de la subunidad A de la celulosa sintasa CelA y BgsA, ambas de *R. etli* CFN42. La predicción de la estructura terciaria se realizó con la herramienta bioinformática Phyre2, usando como modelo la celulosa sintasa BcsA de *Rhodobacter sphaeroides* (PDB 4HG6). En el rectángulo rojo se enmarca el dominio PilZ de CelA.

En Sme, además de la regulación alostérica positiva por la unión del c-di-GMP al dominio C-terminal de BgsA, la producción de MLG se encuentra regulada a nivel transcripcional a través del sistema de *quorum sensing* ExpR/SinI (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). En Ret no está descrito un regulador transcripcional similar a ExpR, por lo que la regulación del MLG en esta especie de rizobio podría ser diferente a la descrita para Sme. Estudios de qRT-PCR y fusiones transcripcionales con el gen reportero *gus* demostraron que en Sme el operón *bgsBA* no está regulado transcripcionalmente por c-di-GMP (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Sin embargo, la regulación transcripcional por c-di-GMP de operones biosintéticos de diferentes EPS, a través de su unión a reguladores transcripcionales, no es rara en bacterias (Chin *et al.*, 2010; Fazli *et al.*, 2011; Hickman & Harwood, 2008).

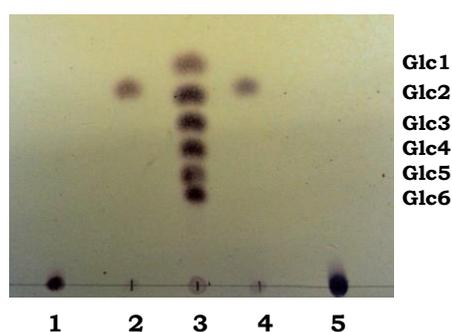
Para determinar la situación en Ret, se llevaron a cabo estudios de expresión génica de los genes *bgsBA* (RHE\_PE00362 y RHE\_PE00363) de Ret, en presencia y ausencia de PleD\*. Para evitar la formación de flóculos y facilitar la manipulación de las bacterias y la posterior extracción de ARN, se emplearon cepas mini-Tn7 delecionadas en el operón de la celulosa (ver apartado 2.2). Estos experimentos mostraron que ambos genes, *bgsB* y *bgsA*, se encontraban ligeramente reprimidos en presencia de altos niveles de c-di-GMP (Fig. 2.3). Las pequeñas reducciones del nivel de transcritos, de 1.76 y 2.35 veces para *bgsB* y *bgsA* respectivamente, apuntan a que, al igual que en Sme, la principal regulación del polisacárido MLG por diguanilato cíclico

estaría ocurriendo a nivel posttraducional, mediante la unión alostérica del c-di-GMP al dominio C-terminal de BgsA.



**Figura. 2.3. Expresión relativa de los genes *bgsB* (negro) y *bgsA* (gris) de *R. etli* CFN42 en presencia y ausencia de PleD\*.** Las cepas mini-Tn7 con y sin PleD\* fueron crecidas en TY a 28°C hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.8-0.9, tras lo cual, se extrajo el ARNm. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes con tres replicas técnicas ± el error estándar. La expresión se normalizó con el gen 16S.

Para comprobar si el glucano de enlaces mixtos (MLG) producido por Ret era igual al producido por Sme, se aisló y purificó siguiendo el protocolo previamente descrito por Pérez-Mendoza y colaboradores (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). La metodología empleada para dicha purificación fue diseñada para una cepa que no produce otros polisacáridos que podrían co-purificarse mediante este procedimiento, como la celulosa. Por tanto, para evitar la contaminación, se empleó una cepa mutante de Ret carente del operón de la celulosa que expresa PleD\* desde el genoma (ver apartado 2.2 de este capítulo). Una vez aislado y purificado el MLG se digirió con la enzima liquenasa. Esta enzima es una endoglucanasa cuyo sitio específico de corte son enlaces  $\beta$  (1-4) inmediatamente precedidos por otros  $\beta$  (1-3). Tras la digestión con esta enzima, los residuos glucosídicos se separaron en una placa cromatográfica en capa fina (TLC) y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos para el MLG de Sme (Fig. 2.4). El MLG producido por Ret también fue hidrolizado por la liquenasa, obteniéndose el mismo producto que con el MLG de Sme, un disacárido como único producto de la digestión (Fig. 2.4). Esto indica que Ret, al igual que en Sme, produce un MLG en el que se alternan enlaces  $\beta$  (1-4) y  $\beta$  (1-3).



**Figura 2.4. Cromatografía en capa fina (TLC) de hidrolizados de MLG con liquenasa.** Línea 1: MLG<sub>Ret</sub> sin digerir, línea 2: MLG<sub>Ret</sub> digerido con liquenasa, línea 4: MLG<sub>Sme</sub> digerido con liquenasa, línea 5: MLG<sub>Sme</sub> sin digerir, línea 3: marcador, formado (de arriba a abajo) por glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa y maltohexosa.

## **2.2. Obtención y caracterización de mutantes en los polisacáridos celulosa y MLG de *Rhizobium etli* CFN42 (Ret).**

Con el objetivo de conocer si las alteraciones en la interacción *R. etli*-*P. vulgaris*, generada por los elevados niveles de c-di-GMP, eran debidas a una superproducción de celulosa y/o MLG, decidimos construir mutantes delecionados para cada uno de estos EPS, así como un mutante doble incapaz de producir celulosa ni MLG. Además, la construcción de estos mutantes nos permitirá estudiar el papel de ambos EPS en vida libre.

### ***2.2.1 Obtención de mutantes en las glicosiltransferasas CelAB y BgsA.***

Las proteínas CelA y CelB son las subunidades catalíticas necesarias para la producción de celulosa, tanto *in vivo* como *in vitro* en bacterias como *G. xylinus* o *R. sphaeroides* (Omadjela *et al.*, 2013; Whitney & Howell, 2012). Con el objetivo de obtener una cepa de Ret incapaz de producir celulosa, decidimos construir un mutante por deleción en los genes *celAB* (RHE\_CH01542- RHE\_CH01543). Para ello se sustituyeron los alelos silvestres por una versión delecionada sin ningún marcador de antibiótico, evitando al mismo tiempo posibles efectos polares sobre genes adyacentes.

La construcción de cepas de Ret carentes del polisacárido MLG, se realizó mediante deleción del gen *bgsA* (RHE\_PE00363), eliminando más de 2/3 del gen. La similitud estructural entre la celulosa y el MLG hace posible considerar cierta redundancia funcional, por lo que se decidió ampliar el objetivo y construir un doble mutante que careciera tanto de celulosa como del MLG.

Con el fin de conocer las funciones de ambos EPS se ensayaron los respectivos mutantes tanto en vida libre como en la interacción simbiótica Ret-*P. vulgaris* y tanto en presencia de elevados niveles de c-di-GMP como con niveles fisiológicos de este segundo mensajero. Para más detalles de la construcción de los mutantes, consultar el anexo 2.

### **2.2.2. Caracterización fenotípica de mutantes en la producción de celulosa y MLG bajo niveles fisiológicos y elevados de c-di-GMP**

Para conseguir elevados niveles intracelulares de c-di-GMP, se introdujo el gen *pleD\** en los mutantes simples *celAB* ( $\Delta$ *celAB*) y *bgsA* ( $\Delta$ *bgsA*) y en el doble mutante *celAB/bgsA* ( $\Delta\Delta$ ), mediante los vectores mini-Tn7 construidos en el Capítulo I de esta tesis doctoral, obteniéndose las cepas delecionadas en el operón de la celulosa con y sin *pleD\** (Ret  $\Delta$ *celAB* Tn7*pleD\**Km y Ret  $\Delta$ *celAB* Tn7Km), cepas delecionadas en *bgsA* con y sin *pleD\** (Ret  $\Delta$ *bgsA* Tn7*pleD\**Km y Ret  $\Delta$ *bgsA* Tn7Km) y el doble mutante en ambos EPS con y sin *pleD\** (Ret  $\Delta\Delta$  Tn7*pleD\**Km y Ret  $\Delta\Delta$  Tn7Km).

La caracterización fenotípica de estos mutantes en vida libre, consistió en la observación de la producción de EPS sobre rojo Congo (CR) o calcoflúor (CF) y la formación de flóculos y biopelículas.

#### **2.2.2.1. Producción de exopolisacáridos**

Las cepas mini-Tn7 delecionadas en el operón de la celulosa, en MLG, los dobles mutantes, así como sus respectivas cepas parentales con y sin *PleD\**, fueron crecidas sobre medio mínimo sólido adicionado de CR o CF (Fig. 2.5 A y B). Las cepas Ret  $\Delta$ *celAB* Tn7*pleD\**Km y  $\Delta$ *bgsA* Tn7*pleD\**Km seguían manteniendo un color rojo intenso al crecer sobre CR, similar a la cepa parental Ret Tn7*pleD\**Km. El fenotipo CR<sup>+</sup> desaparecía en el doble mutante expresando *pleD\**, lo que indicaba que era necesaria la pérdida de ambos EPS para la obtención de un fenotipo CR<sup>-</sup>.

Otro dato a destacar es que en condiciones fisiológicas de c-di-GMP (ausencia de *pleD\**), se observó un color más blanquecino en las colonias de las cepas Ret  $\Delta$ *celAB* Tn7Km y Ret  $\Delta\Delta$  Tn7Km, en comparación con la cepa parental (Fig. 2.5 A), indicando que en estas condiciones parece haber una producción basal de celulosa en Ret. Sin embargo, estos mutantes  $\Delta$ *celAB*, tanto en niveles altos como fisiológicos de c-di-GMP,

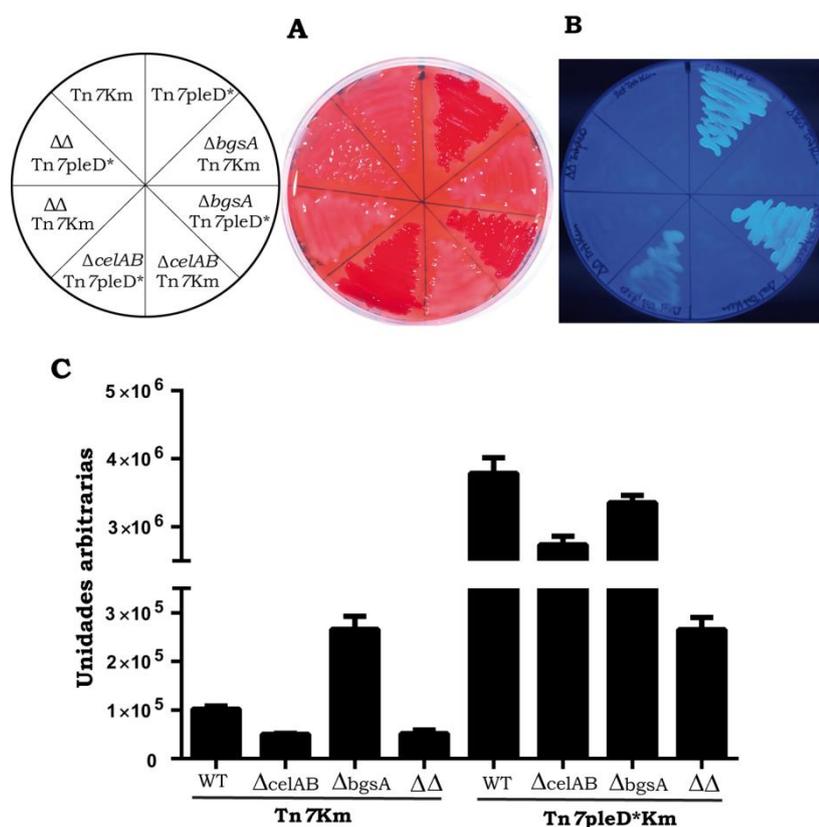
no formaban las colonias tan rugosas en comparación con las cepas parentales, sino que su aspecto era más mucoso (Fig. 2.5 A). Esto sugería que, al igual que ocurre en *A. tumefaciens*, *Salmonella typhimurium* y *E. coli*, la celulosa es necesaria para el aspecto rugoso de las colonias de Ret crecidas en medio sólido (Barnhart *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2009; Zogaj *et al.*, 2001).

El mismo comportamiento se observó sobre calcoflúor, las cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km y Ret  $\Delta$ bgsA Tn7pleD\*Km seguían mostrando fluorescencia intensa bajo luz ultravioleta, similar a la cepa parental Ret Tn7pleD\*Km, mientras que el doble mutante perdía esta capacidad aún con elevados niveles de c-di-GMP (Fig. 2.5 B).

La fluorescencia de los cultivos se cuantificó mediante el empleo de un fluorímetro. En condiciones fisiológicas de c-di-GMP, la cepa Ret  $\Delta$ celAB Tn7Km mostró un descenso de 2 veces en la fluorescencia en comparación con la cepa silvestre. Dicha diferencia hace de nuevo referencia a la producción basal de celulosa en estas condiciones. Sin embargo, en la cepa Ret  $\Delta$ bgsA Tn7Km, se observó un incremento de la fluorescencia de 2.6 veces con respecto a la cepa silvestre; esto podría deberse a un incremento de la producción de celulosa u otro polisacárido en respuesta a la pérdida del gen *bgsA* (Fig. 2.5 C).

La expresión de la DGC PleD\* en la cepa silvestre provocaba un aumento en la fluorescencia de 37 veces en comparación con la cepa sin *pleD\** (Fig. 2.5 C). Sin embargo, este aumento fue ligeramente menor en las cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km y Ret  $\Delta$ bgsA Tn7pleD\*Km, con incrementos de 26 y 32 veces, respectivamente. Esto indicaba la contribución de ambos polisacáridos a la fluorescencia emitida por la cepa silvestre con altos niveles de c-di-GMP. Además, la suma de la fluorescencia de cada uno de los mutantes simples era mayor que la producida por la cepa parental expresando PleD\*, lo que sugería que la pérdida de uno de estos EPS influye sobre la producción del otro. En la cepa Ret  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km, la fluorescencia emitida por los cultivos descendía drásticamente, indicando que la celulosa y el MLG eran los principales responsables del incremento de fluorescencia en respuesta a los altos niveles de c-di-GMP en Ret. Sin embargo, los niveles de fluorescencia de esta cepa todavía fueron 2.5 veces más elevados que la cepa parental en condiciones fisiológicas de c-di-GMP, sugiriendo que los elevados niveles de c-di-GMP incrementaban la producción de al menos un tercer EPS en Ret (Fig. 2.5 C). Estos resultados muestran la idoneidad del

empleo de un fluorímetro para la cuantificación de los EPS producidos por Ret en presencia de CF. La mayor sensibilidad de la técnica permite poner de manifiesto la presencia de otros EPS que no pueden ser detectados visualmente en placas con CF.

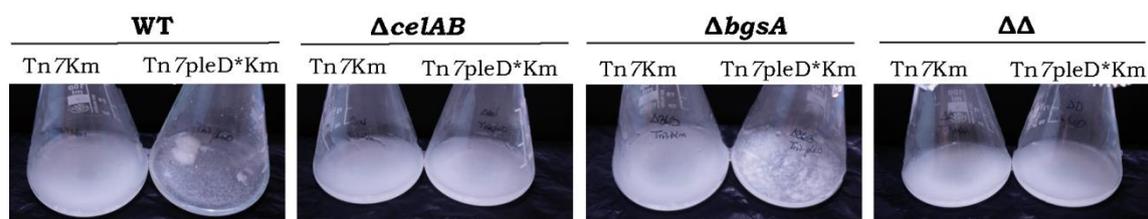


**Figura 2.5. Contribución de la celulosa y el MLG a los fenotipos CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup> de *R. etli* CFN42 con alto contenido de c-di-GMP.** Mutantes simples en el operón de la celulosa ( $\Delta celAB$ ), en *bgsA* ( $\Delta bgsA$ ), el doble mutante ( $\Delta\Delta$ ) y sus respectivas cepas parentales (WT) con o sin *pleD*\*, fueron crecidas en medio mínimo adicionado con rojo Congo (A, 125  $\mu$ g/ml) o calcoflúor (B, 200  $\mu$ g/ml). Las placas fueron fotografiadas tras 48 horas de crecimiento a 28°C. (C) Cuantificación de la fluorescencia emitida por cultivos líquidos en medio con CF. Las barras representan la media de tres replicas biológicas con tres replicas técnicas  $\pm$  desviación estándar.

#### 2.2.2.2. Capacidad de floculación

Otro de los fenotipos observados como consecuencia del aumento de la producción de EPS, es el incremento de formación de flóculos compactos en cultivos líquidos (Fig. 2.6). Como ya se indicó en el capítulo anterior, la sobreexpresión de *PleD*\* provocó una abundante formación de flóculos por Ret. La cepa Ret  $\Delta bgsA$  Tn7pleD\*Km, continuaba produciendo flóculos en presencia de elevados niveles de c-di-GMP, aunque estos eran de menor tamaño (Fig. 2.6). Por el contrario, tanto la cepa Ret  $\Delta celAB$  Tn7pleD\*Km como el doble mutante Ret  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km, perdían tal

capacidad de flocular, comportándose de forma similar a las cepas con niveles fisiológicos de c-di-GMP. Estos resultados indicaban que es la celulosa la principal responsable de la floculación de Ret en medio líquido.

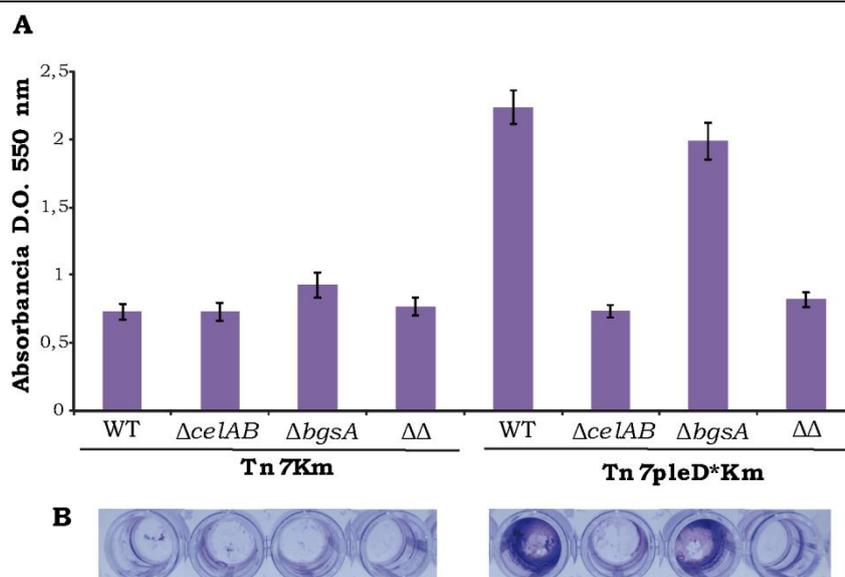


**Figura 2.6** Papel de los polisacáridos celulosa y MLG en la floculación de *R. etli* CFN42 con alto contenido de c-di-GMP. Las cepas arriba indicadas, incapaces de producir celulosa ( $\Delta celAB$ ), MLG ( $\Delta bgsA$ ) o ambos exopolisacáridos ( $\Delta\Delta$ ), con y sin PleD\*, fueron crecidas en agitación en medio mínimo durante 24 horas para la observación de los floculos.

### 2.2.2.3. Formación de biopelículas

Para determinar el papel que desempeñan los polisacáridos celulosa y MLG en las biopelículas desarrolladas por Ret sobre superficies abióticas, en condiciones fisiológicas de c-di-GMP y en presencia de altos niveles de este segundo mensajero, se llevó a cabo el crecimiento de las distintas cepas en placas multipocillo, para la posterior tinción de la biopelícula producida con cristal violeta (para más información ver el apartado 1.8 de la sección materiales y métodos).

En condiciones fisiológicas de c-di-GMP, no se observaron diferencias significativas en la producción de biopelículas entre los mutantes *celAB*, *bgsA* o el doble mutante con respecto a la cepa parental (Fig. 2.7). Como ya se mostró en el capítulo anterior, los elevados niveles de c-di-GMP provocan en Ret un significativo incremento de la producción de biopelículas, incremento que fue también visible en la cepa mutante Ret  $\Delta bgsA$  Tn7pleD\*Km. Dicho incremento, sin embargo, estuvo ausente en los mutantes Ret  $\Delta celAB$  Tn7pleD\*Km y  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km, que mostraron un comportamiento similar al de la cepa parental en condiciones fisiológicas de c-di-GMP (Fig. 2.7). Estos resultados sugieren que el MLG no interviene en la formación de biopelículas sobre superficies abióticas, sino que es la celulosa el principal polisacárido responsable de la adhesión de Ret a este tipo de superficies en respuesta a los altos niveles intracelulares de c-di-GMP.

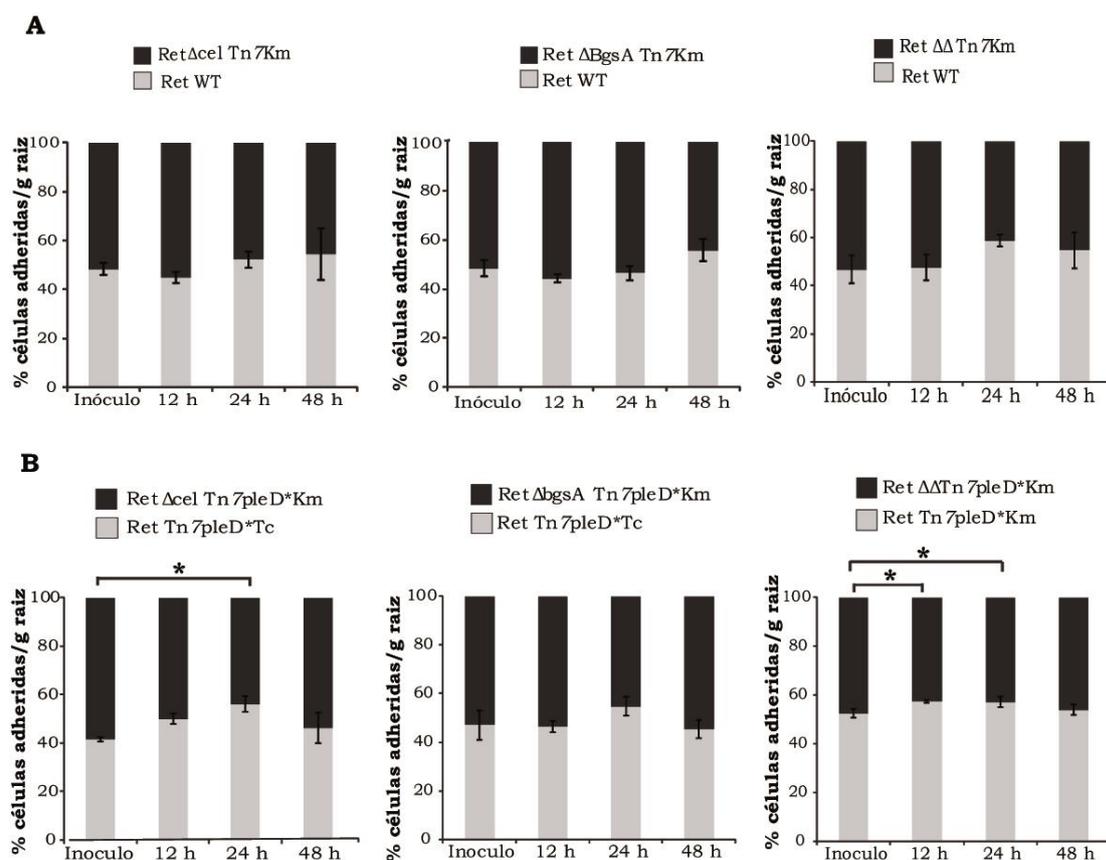


**Figura 2.7. Papel de la celulosa y el MLG en la formación de biopelículas por *R. etli* CFN42.** A) Biopelículas formadas por las cepas de Ret mutantes en el operón de la celulosa ( $\Delta celAB$ ), en *bgsA* ( $\Delta bgsA$ ), el doble mutante *celAB/bgsA* ( $\Delta\Delta$ ) en comparación con sus respectivas cepas parentales, con y sin PleD\*. La cuantificación se llevó a cabo tras 72 horas de crecimiento en medio mínimo en placas de 96 pocillos. Las barras representan la media de 8 pocillos  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. B) Biopelículas adheridas a los pocillos de las placas de poliestireno, teñidas con CV, antes de la resuspensión con etanol.

#### 2.2.2.4. Adhesión a raíces

Uno de los primeros pasos hacia la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, es la adhesión de los rizobios a las raíces de sus respectivas plantas hospedadoras (Ausmees *et al.*, 2001a; Danhorn & Fuqua, 2007). Los EPS secretados por los rizobios son clave en este proceso de adhesión. En *Sme* y *Rle*, se ha demostrado la participación del MLG y de la celulosa en la adhesión a raíces de alfalfa y veza, respectivamente (Laus *et al.*, 2005; Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Para determinar la importancia de estos dos EPS en la adhesión de Ret a raíces de judía, realizamos ensayos de adhesión competitiva de las bacterias, tanto en condiciones fisiológicas de c-di-GMP como en condiciones elevadas de este segundo mensajero. En el primero de los casos, para facilitar la selección de las cepas, se emplearon las versiones mini-Tn7Km de los distintos mutantes *versus* la cepa silvestre (Fig. 2.8 A). En condiciones de elevados niveles de c-di-GMP, las cepas  $\Delta celAB$  Tn7pleD\*Km y  $\Delta bgsA$  Tn7pleD\*Km fueron diferenciadas de la cepa parental Ret Tn7pleD\*Tc, mediante selección por los diferentes marcadores de resistencia a antibiótico. Sin embargo, la cepa Ret  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km se enfrentó a su cepa parental Ret Tn7pleD\*Km, por lo que la diferenciación fue posible

por la diferente tinción de las colonias en medio con CR (colonias rojas, cepa parental; colonias blancas, doble mutante) (Fig. 2.8 B).



**Figura 2.8. Papel de los polisacáridos celulosa y glucano de enlaces mixtos (MLG) en la adhesión de *R. etli* a las raíces de judía.** Mezclas 1:1 (inóculo) de las bacterias se pusieron en contacto con raíces de judía durante 12, 24 o 48 horas. A) Adhesión competitiva en condiciones fisiológicas de c-di-GMP. B) Adhesión competitiva en condiciones de elevados niveles de c-di-GMP. Las barras indican la proporción de UFC de los mutantes (en negro) y de las cepas control (en gris)  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas empleando un análisis de la varianza con un nivel de significación  $\alpha=0.1$

En los ensayos de adhesión competitiva realizados en condiciones fisiológicas de c-di-GMP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos mutantes y sus respectivas cepas parentales (Fig. 2.8 A). Estos datos sugerían que en un escenario de niveles fisiológicos de c-di-GMP, no se dan las condiciones necesarias para la producción significativa de celulosa y MLG. Por ello, decidimos incluir ensayos de adhesión competitiva con altos niveles de c-di-GMP.

En altos niveles de c-di-GMP, los mutantes Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km y Ret  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km fueron estadísticamente menos competitivos en adhesión que sus respectivas cepas parentales, alcanzándose las mayores diferencias a las 24 horas de incubación (Fig. 2.8 B). Sin embargo, estas ligeras diferencias parecían revertir a las 48

horas, cuando la capacidad de adhesión del mutante en celulosa y del doble mutante volvía a ser similar al de sus cepas parentales. Por el contrario, la cepa Ret  $\Delta$ bgsA Tn7pleD\*Km no presentó diferencias significativas con respecto a su cepa parental. Estos datos indicaban que en presencia de altos niveles de c-di-GMP, la celulosa podría ser más importante que el MLG para la adhesión de Ret a las raíces de judía.

### 2.2.2.5. Fenotipo simbiótico

Los resultados de los experimentos de adhesión, tanto sobre superficies abióticas como bióticas, indicaron que la celulosa contribuye de manera más importante que el MLG a dicha adhesión. No obstante, la contribución de la celulosa a la adhesión de raíces de judía parecía poco significativa, pues mutantes deficientes en la producción de este EPS, todavía generaron una adhesión aceptable a las raíces de judía, al menos en las condiciones ensayadas. Con el objetivo de analizar la influencia de los EPS celulosa y MLG de Ret en estadios posteriores de la interacción simbiótica, se llevaron a cabo ensayos de infectividad de plantas de judía en jarras Leonard.

Debido a la gran cantidad de espacio y tiempo consumidos por los ensayos de plantas, se decidió estudiar inicialmente el comportamiento simbiótico del mutante en celulosa, con el que se obtuvieron los resultados más significativos, así como el doble mutante en ambos EPS, con y sin *pleD\** en comparación con sus respectivas cepas parentales. Estos ensayos se realizaron con la variedad Negro Jamapa, procedente de México, la misma que la que se aisló por primera vez la cepa *R. etli* CFN42 (Quinto *et al.*, 1985).

Tras 29 días post-inoculación, se determinaron el peso fresco y peso seco de la parte aérea (PA), el contenido de nitrógeno de la PA y el número de nódulos por planta.

La presencia de nódulos rosáceos en todas las plantas inoculadas indicaba que todos los mutantes de Ret analizados eran capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (datos no mostrados). Como se describió en el capítulo anterior, los altos niveles de diguanilato cíclico redujeron de forma muy significativa la eficiencia de la simbiosis Ret-judía. En esta ocasión, el objetivo era determinar la implicación de la celulosa y el MLG en la simbiosis, por lo que el análisis se centró en identificar posibles diferencias entre los mutantes y la cepa silvestre, tanto con niveles fisiológicos como elevados de c-di-GMP.

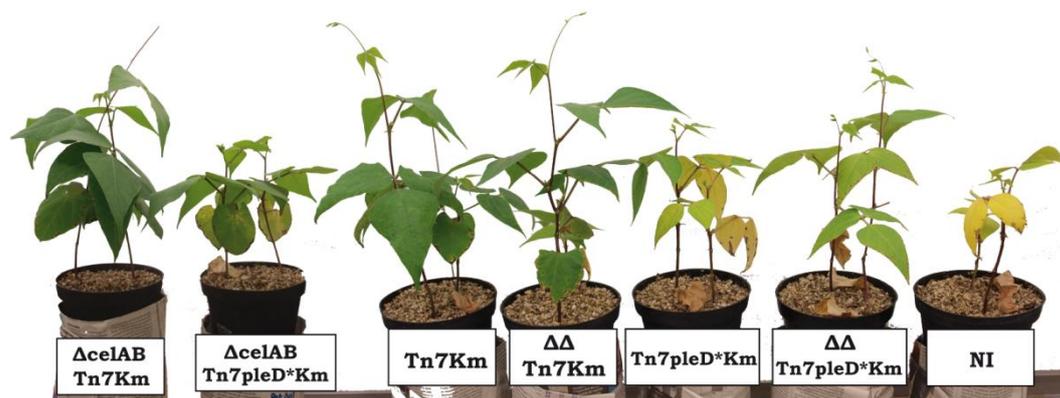
En la tabla 2.1 podemos observar que en condiciones fisiológicas de c-di-GMP, la ausencia de los polisacáridos celulosa y MLG no tuvo ningún efecto significativo sobre la interacción simbiótica Ret-judía, no encontrándose diferencias significativas entre los mutantes y la cepa silvestre, en ninguno de los parámetros analizados (Fig. 2.9).

En condiciones de elevados niveles de c-di-GMP, las plantas inoculadas con los mutantes en celulosa y por el doble mutante Cel<sup>-</sup> MLG<sup>-</sup>, no presentaron diferencias significativas en el porte aéreo de las plantas (peso fresco y peso seco) en comparación con las plantas inoculadas con la cepa parental Ret Tn7pleD\*Km. Sin embargo, la cepa Ret ΔcelAB Tn7pleD\*Km presentó un número significativamente mayor de nódulos y el nitrógeno fijado por esta cepa fue superior a la cepa parental, indicando que la ausencia de celulosa podría suponer una ventaja en condiciones de elevados niveles de c-di-GMP. Sin embargo, el doble mutante Ret ΔΔ Tn7pleD\*Km solo presentó diferencias significativas con respecto a la cepa parental en la cantidad de nitrógeno fijada, alcanzando valores intermedios entre el mutante en celulosa y la cepa parental en el resto de parámetros. Estos resultados indican que en presencia de elevados niveles de c-di-GMP, la superproducción de celulosa y MLG en Ret no eran los responsables del deficiente fenotipo simbiótico de *R. etli*, y que las alteraciones observadas son debidas a otros efectos de las elevadas concentraciones de este dinucleótido en la bacteria.

**Tabla 2.1. Eficiencia simbiótica de las distintas cepas de *R. etli* tras la interacción con *P. vulgaris* var. Negro Jamapa**

Cepa	Peso fresco PA (g)	Peso seco PA (g)	Nº nódulos	Nitrógeno total (mg/planta)
Ret Tn7Km	3.59 ± 0.61	0.44 ± 0.20	163 ± 24	16.40 ± 2.57
Ret ΔcelAB Tn7Km	3.05 ± 0.13	0.49 ± 0.14	184 ± 16	21.83 ± 1.75
Ret ΔΔ Tn7Km	3.29 ± 0.32	0.43 ± 0.16	160 ± 19	17.65 ± 1.93
Ret Tn7pleD*Km	1.83 ± 0.24	0.31 ± 0.06	79 ± 9	4.54 ± 0.68 <sup>†</sup>
Ret ΔcelAB Tn7pleD*Km	2.28 ± 0.11	0.48 ± 0.03	149 ± 12 <sup>†</sup>	12.90 ± 2.10 <sup>††</sup>
Ret ΔΔ Tn7pleD*Km	2.32 ± 0.16	0.38 ± 0.04	108 ± 8	8.76 ± 0.85 <sup>†††</sup>

†, ††, ††† Diferencias estadísticamente significativas según un test de Anova ( $p < 0.05$ ) entre las medias de cada columna. Para el análisis estadístico, los datos de las cepas con niveles fisiológicos de c-di-GMP fueron analizados de forma independiente a los obtenidos por las cepas con elevados niveles de c-di-GMP.

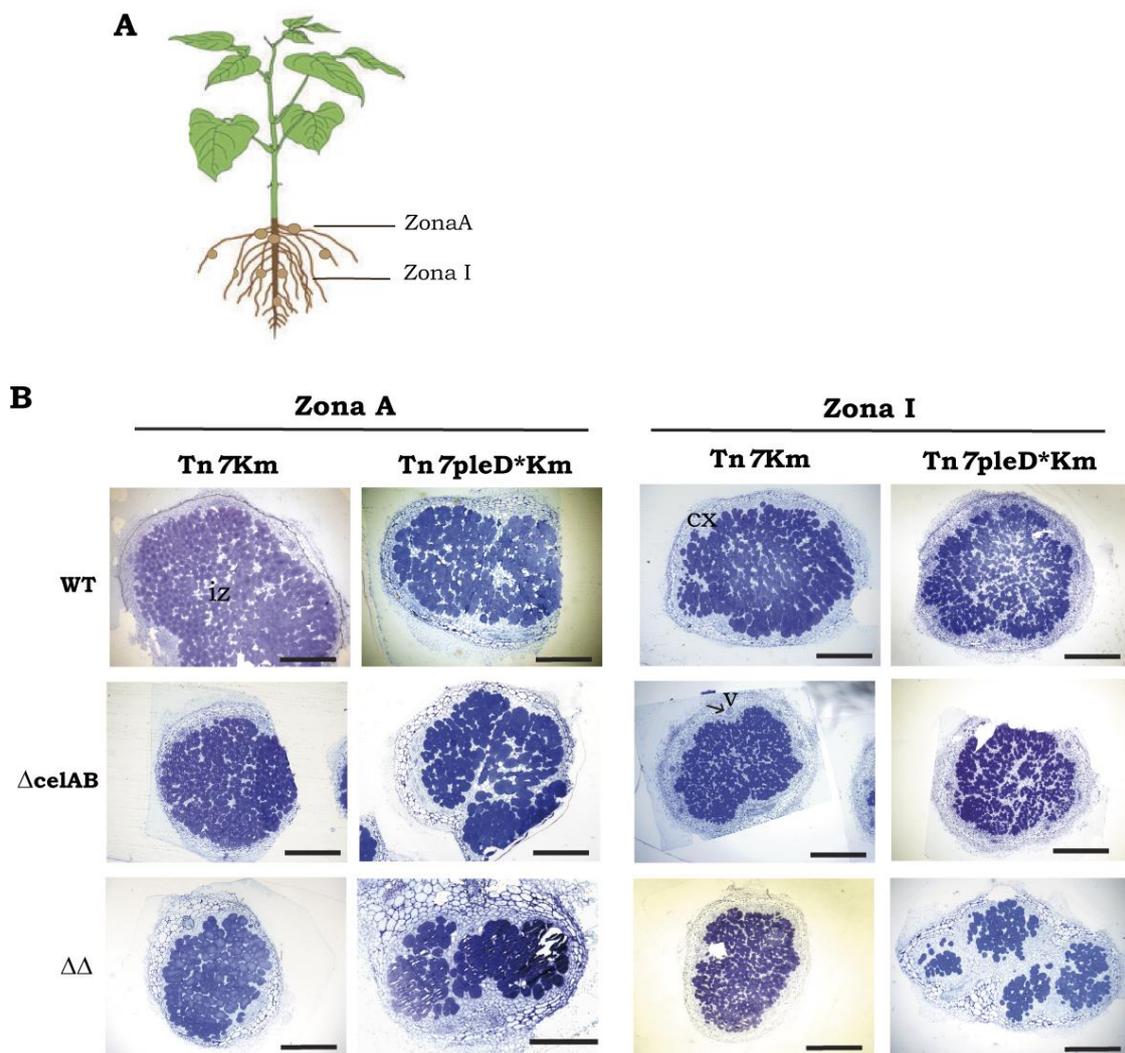


**Figura 2.9. Impacto de los polisacáridos celulosa y MLG sobre el establecimiento de la simbiosis *R. etli*-judía.** Aspecto de plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Jamapa inoculadas con cepas derivadas de *R. etli* CFN42 carente de uno o ambos EPS, con y sin *pleD*\*. Las imágenes fueron tomadas 29 días después de la inoculación.

#### 2.2.2.6. Observación de bacteroides y cortes de nódulo al microscopio óptico

Para profundizar un poco más en los posibles efectos del c-di-GMP y en particular la superproducción de EPS, sobre el desarrollo de los nódulos, se realizó un estudio microscópico que consistió en la visualización de bacteroides y la organización histológica de nódulos al microscopio óptico. Se emplearon nódulos formados por cepas mini-Tn7 productoras y no productoras de celulosa y MLG, con y sin *PleD*\*. Se diferenció además entre dos tipos de nódulos en relación a su posición en la raíz: i) zona A, nódulos cercanos al cuello o corona de la raíz, generalmente situados sobre la raíz principal, que son los formados más tempranamente y por tanto de mayor edad; y ii) zona I, nódulos alejados de la corona, algunos sobre la raíz principal pero sobre todo en raíces secundarias, cuya formación es posterior, en algunos casos no completamente maduros (Fig. 2.10 A).

El azul de toluidina es un colorante básico que tiñe estructuras ácidas como los ácidos nucleicos, siendo útil para la visualización de las células vegetales infectadas por rizobios, dando un color azul característico. En la figura 2.10 B podemos observar cortes representativos de nódulos infectados por las cepas de *Ret* delecionadas en el operón de la celulosa, el doble mutante y sus respectivas cepas parentales con y sin *pleD*\*.

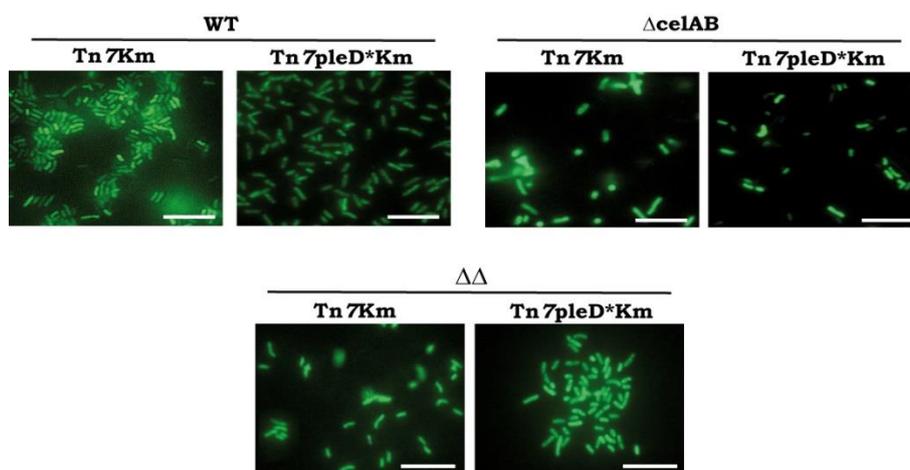


**Figura 2.10. Organización histológica de nódulos de judía infectados por cepas de *R. etli* con altos niveles de c-di-GMP.** A) Esquema representativo donde se indican las dos zonas de procedencia de los nódulos, A (corona de la raíz) e I (alejados de la corona). B) Secciones (1  $\mu$ m) de nódulos de judía de 29 días, infectados por las cepas indicadas, teñidos con azul de toluidina; iz, zona de infección; cx, células del córtex; v, haces vasculares. Las barras indican la escala, 500  $\mu$ m.

Los cortes semifinos de nódulos infectados por la cepa control Ret Tn7Km, mostraron un desarrollo normal, donde toda la zona central del nódulo (zona de infección, iz) se encuentra ocupada principalmente por células vegetales cargadas de bacteroides (teñidas de azul intenso), con algunas células no infectadas, generalmente de menor tamaño, que aparecen sin teñir. Rodeando a esta zona encontramos células del córtex (cx) y haces vasculares (v). Lo mismo ocurría en los nódulos infectados por la cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7Km y Ret  $\Delta\Delta$  Tn7Km, tanto de la zona A como de la zona I. Sin embargo, en los nódulos infectados por las cepas que expresaban *pleD\**, el patrón de infección se encontraba alterado, ya que la zona central presentaba un mayor número de

células no infectadas, quedando grandes zonas sin teñir (Fig. 2.10 B). Además, en estos nódulos se podían observar una distribución menos uniforme de las células infectadas y las intersticiales, con una distribución de las células infectadas en sectores separados por grupos de células no infectadas. Sorprendentemente, este patrón de distribución en sectores se vio acentuado en los nódulos formados por las cepas mutantes para celulosa y MLG. De esta forma, las alteraciones más evidentes las encontramos en los nódulos infectados por la cepa Ret  $\Delta\Delta$  Tn7pleD\*Km, en los que los sectores de células infectadas eran de menor tamaño y más distantes entre sí, separados por numerosas células no infectadas (Fig. 2.10 B).

Para la observación de los bacteroides, nódulos frescos se cortaron sobre un portaobjetos con una cuchilla metálica y los bacteroides liberados fueron teñidos con el fluoróforo SYTO 13, el cual se une de forma específica a ácidos nucleicos. Como se aprecia en la figura 2.11, todos los bacteroides de las seis cepas analizadas mostraron la misma morfología de bacilo, típica de los bacteroides de Ret.



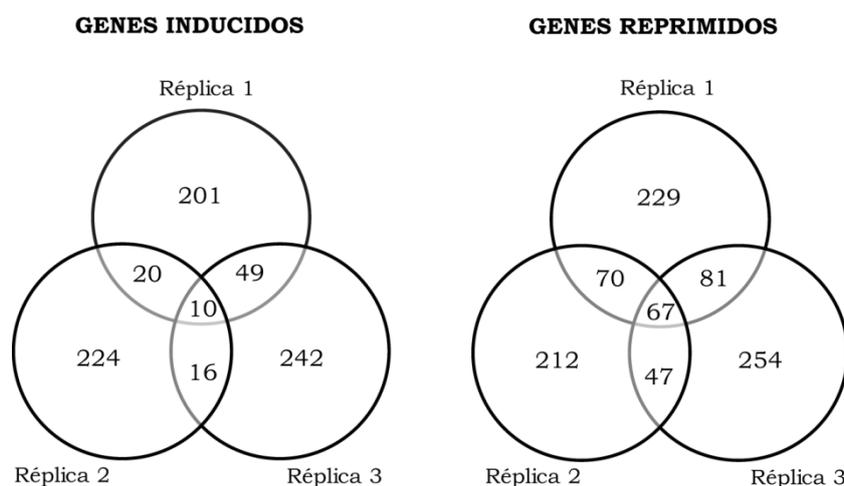
**Figura 2.11. Bacteroides aislados de nódulos infectados por las cepas derivadas de Ret CFN42.** Los bacteroides fueron teñidos con SYTO 13 y observados en un microscopio de fluorescencia. Las barras indican la escala, 10  $\mu$ m.

### **2.3. Impacto del c-di-GMP en el transcriptoma de *Rhizobium etli* CFN42**

La sobreproducción de celulosa y MLG en respuesta a elevados niveles de c-di-GMP, no son los responsables de la menor eficiencia simbiótica observada en la interacción simbiótica Ret-judía. Con el objetivo de conocer posibles cambios en la expresión génica de Ret producidos por elevados niveles de c-di-GMP, se compararon los transcritos de las cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km (altos niveles de c-di-GMP) y Ret

$\Delta$ celAB Tn7Km (niveles fisiológicos de c-di-GMP). Se emplearon *microarrays* del genoma completo de *R. etli* CFN42 desarrollados en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Salazar *et al.*, 2010), en donde están representados los 6.034 marcos de lectura abierta identificados en el genoma de esta bacteria.

Empleando el criterio de selección de  $Z$ -score  $>1.5$ , se observó que los elevados niveles de c-di-GMP producidos por la sobreexpresión de la DGC PleD\* desde el genoma, alteran la expresión de un total de 77 genes, de los cuales 67 mostraron expresión disminuida en presencia de altos niveles de c-di-GMP y solo 10 genes mostraban niveles de expresión superiores a los de la cepa control, con niveles fisiológicos de este segundo mensajero (Fig. 2.12). El bajo número de genes con expresión cambiante indicaba que el c-di-GMP parece tener un efecto menor sobre el transcriptoma de *R. etli*.



**Figura 2.12. Genes diferencialmente expresados en presencia de altos niveles de c-di-GMP.** En cada diagrama de Venn se recoge el número de genes inducidos (izquierda) y reprimidos (derecha) en cada replica biológica, en presencia de altos niveles de c-di-GMP en comparación con niveles fisiológicos de este segundo mensajero.

En la tabla 2.2 se muestra todos los genes identificados como diferencialmente expresados en las tres replicas biológicas, con el valor medio del  $Z$ -score obtenido. Un valor negativo de  $Z$ -score significa reducción del número de transcritos, mientras que un valor positivo indicaría aumento.

**Tabla 2.2. Genes diferencialmente expresados en respuesta a elevados niveles intracelulares de c-di-GMP.**

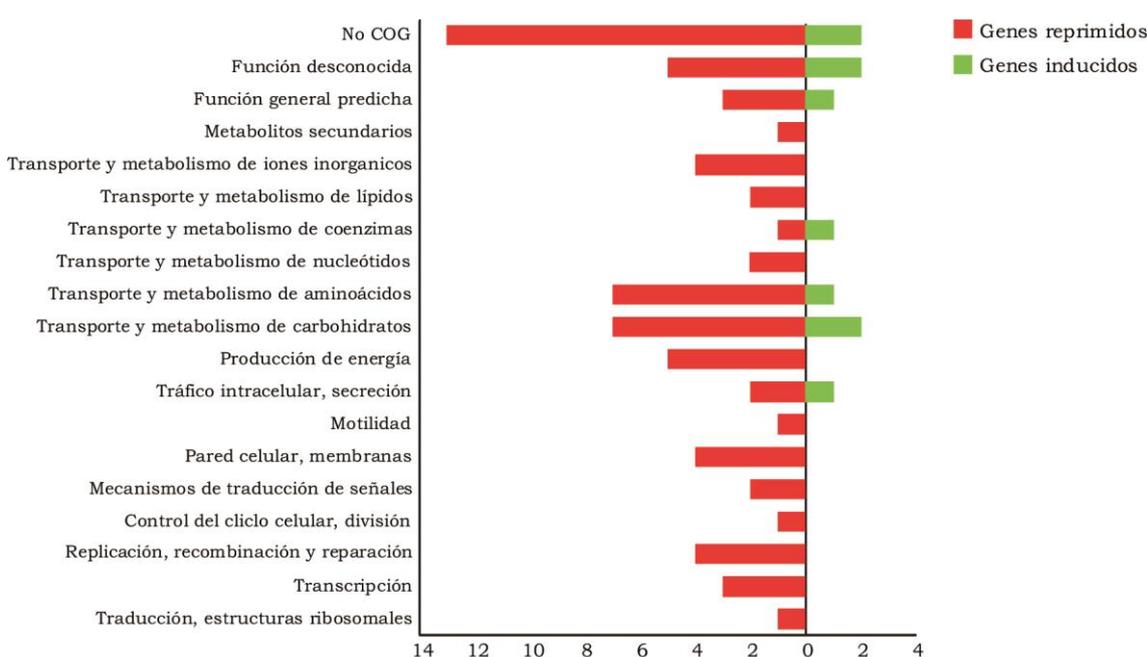
Gen	Función	Valor medio de Z-score
RHE_CH00044	Proteína hipotética	-2,49
RHE_CH00076	D-2-hidroxiácido dehidrogenasa	-1,78
RHE_CH00099	Proteína hipotética	-2,91
RHE_CH00152 ( <i>ftsK1</i> )	Proteína de división celular	-2,73
RHE_CH00160	Transportador ABC de fosfonato	-2,01
RHE_CH00186	Proteína hipotética	-2,53
RHE_CH00209	Proteína de ensamblaje de pilus	-2,22
RHE_CH00377 ( <i>olsA</i> )	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	-2,04
RHE_CH00484	Transportador de prolina/glicina betaína ABC, permeasa	-2,39
RHE_CH00496	Regulador transcripcional	-2,50
RHE_CH00695 ( <i>aglR</i> )	Regulador transcripcional de tipo LacI	-2,32
RHE_CH00708 ( <i>mcpZch1</i> )	Proteína aceptora de metilo (methyl-accepting chemotaxis protein)	-2,25
RHE_CH00743	Proteína hipotética	-2,10
RHE_CH00806	NTP pirofosfohidrolasa de la familia MutT/NUDIX	-2,10
RHE_CH00889	Proteína hipotética	-2,41
RHE_CH01025	Proteína hipotética	-2,65
RHE_CH01101	Pseudogen	-2,32
RHE_CH01302	ADN polimerasa (bacteriophage type protein)	-1,83
RHE_CH01380	Mureína transglicosilasa	-2,09
RHE_CH01385 ( <i>relA</i> )	guanosina-3' 5'-bis-3'-pirofosfohidrolasa	-2,63
RHE_CH01437 ( <i>rplI</i> )	50S proteína ribosomal L9	-1,97
RHE_CH01557	Transportador ABC de azúcares, permeasa	-3,32
RHE_CH01590 ( <i>hrm</i> )	Proteína de unión al nucleóide	-4,04
RHE_CH01598	Proteína hipotética	-2,85
RHE_CH01729	Oxidorreductasa	-2,18
RHE_CH01906 ( <i>clpS</i> )	Subunidad S de la proteasa Clp	-2,57
RHE_CH01953	D-aminoácido aminotransferasa	-1,70
RHE_CH01985	Proteína hipotética	-2,05
RHE_CH02168	Transglutaminasa	-2,08
RHE_CH02203	Fosfoesterasa	-2,41
RHE_CH02588	Pseudogen	-2,23
RHE_CH02658	Transportador ABC de azúcares, permeasa	-2,38
RHE_CH02750 ( <i>ugpEch1</i> )	Transportador ABC sn-glicerol-3-fosfato, permeasa	-2,16
RHE_CH02827	Proteína aminopeptidasa P	-2,25
RHE_CH02843 ( <i>ddl</i> )	D-alanina-D-alanina ligasa	-2,42
RHE_CH02877	Acil-CoA transferasa /L-carnitina deshidratasa	-2,64
RHE_CH03130 ( <i>guaD</i> )	Guanina deaminasa	-2,49
RHE_CH03146	Sensor de dos componentes, histidina quinasa	-2,82
RHE_CH03153	Regulador transcripcional tipo AraC	-2,10
RHE_CH03154	Transportador, permeasa	-3,27
RHE_CH03235 ( <i>pssN</i> )	Proteína de exportación de exopolisacárido	-3,32

RHE_CH03295	Transportador ABC de nitrato/sulfonato, permeasa	-2,30
RHE_CH03528	Transportador, permeasa	-2,22
RHE_CH03707	Transportador ABC de azúcares, permeasa	-1,73
RHE_CH03741 ( <i>nuoF2</i> )	NADH-ubiquinona oxidorreductasa cadena F	-1,58
RHE_CH03780	Transportador de cationes	-3,34
RHE_CH03785 ( <i>alkA</i> )	ADN-3-metil-adenina glicosidasa II	-1,99
RHE_CH03882 ( <i>lpdAch2</i> )	Dihidrolipoamida dehidrogenasa	-2,38
RHE_CH03939	Transportador ABC, permeasa	-2,23
RHE_CH04012 ( <i>mtgA</i> )	Peptidoglicano transglicosilasa	-2,34
RHE_CH04020	Proteína hipotética	-2,14
RHE_PC00134	Regulador transcripcional tipo Cro/CI	-2,23
RHE_PC00155	Proteína hipotética	-2,34
RHE_PC00183	Transportador ABC de aminoácidos, permeasa	-2,66
RHE_PC00188	Proteína hipotética	-2,05
RHE_PD00047	Proteína hipotética	-2,04
RHE_PD00198 ( <i>nifN</i> )	Nitrogenasa (cofactor molibdeno)	-1,66
RHE_PE00031	Transportador ABC permeasa	-2,28
RHE_PE00177	Adenilato ciclasa	-1,99
RHE_PE00199	Acetiltransferasa	-2,86
RHE_PE00318	Proteína hipotética	-2,38
RHE_PF00177	Proteína hipotética	-2,02
RHE_PF00191	Transportador ABC de aminoácidos, permeasa	-2,77
RHE_PF00323	Fosfoglicerato mutasa	-2,11
RHE_PF00388	Dioxigenasa oxidorreductasa	-2,70
RHE_PF00389	Ferredoxina oxidorreductasa	-2,25
RHE_PF00537	Proteína hipotética	-1,74
RHE_CH00410	Proteína hipotética	2,17
RHE_CH00492	Transportador ABC de azúcares, proteína de unión a sustrato	1,78
RHE_CH01246	Proteína hipotética	1,94
RHE_CH01832 ( <i>secD2</i> )	Proteína bifuncional, translocasa subunidad SecD	1,63
RHE_CH02752	Transportador ABC de sn-glicerol-3-fosfato, proteína de unión a sustrato	2,13
RHE_CH03501	Proteína de síntesis de fenazina	1,89
RHE_CH03841	Proteína hipotética	2,05
RHE_PA00137	Transposasa	1,70
RHE_PB00081	Tiamina FAD oxidorreductasa	1,81
RHE_PD00121	GTP ciclohidrolasa II	1,54

De los 67 genes reprimidos, 16 de ellos se localizan en los plásmidos simbióticos p42c, p42d, p42e y p42f, siendo este último el más representado con 6 genes reprimidos. El resto de los 51 genes reprimidos son cromosómicos. De los 10 genes sobreexpresados en presencia de elevados niveles de c-di-GMP, 7 tienen localización cromosómica y 3 se encuentran en plásmidos.

Teniendo en cuenta el porcentaje de genes de Ret distribuidos en los distintos replicones (53% cromosoma y 47% en los 6 plásmidos), el análisis transcriptómico revela que elevados niveles de c-di-GMP principalmente alteran la expresión de genes cromosómicos, ya que encontramos un 75.3% de genes cromosómicos diferencialmente expresados frente al 24.6% de genes plasmídicos.

Al agrupar los 77 genes diferencialmente expresados en las categorías funcionales recogidas en la base de datos COG “Clusters of Orthologous Groups of proteins” (Tatusov *et al.*, 2000), observamos que existe un elevado número de genes que no pertenecen a ninguna categoría funcional o su función es desconocida (Fig. 2.13), lo que limita la posible comprensión del efecto del c-di-GMP sobre la fisiología de esta bacteria. Además, entre los genes reprimidos encontramos mayor representación de genes que están implicados en el transporte y metabolismo de aminoácidos y carbohidratos (Fig. 2.13).



**Figura 2.13. Clasificación en categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados en presencia de altos niveles de c-di-GMP.** Las categorías funcionales se han establecido de acuerdo a la base de datos COG. En rojo se representan los genes reprimidos mientras que en verde se muestran los genes inducidos por c-di-GMP.

Como se ha observado en el capítulo 1 de esta tesis doctoral, el c-di-GMP regula de forma negativa distintos tipos de motilidad bacteriana, por lo que llama la atención el hecho de que no haya aparecido ningún gen flagelar controlado negativamente por c-di-

GMP a nivel transcripcional. Solo encontramos un gen que interviene en quimiotaxis, RHE\_CH00708 (*mcpZch1*) que codifica una proteína aceptora de grupos metilo (MCP) con un dominio sensor HAMP (*Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases*) (Aravind & Ponting, 1999).

Entre los genes con mayores niveles de represión por la presencia de elevados niveles de c-di-GMP, encontramos el gen RHE\_CH01590 (*hrm*) que codifica para una proteína de unión al DNA, que en *E. coli* interviene en la condensación del cromosoma, ejerciendo una función similar a las histonas eucariotas (Hubscher *et al.*, 1980). Otro de los genes reprimidos a destacar es RHE\_CH03235 (*pssN*), implicado en la secreción del EPS ácido, formando complejos en la membrana externa con PssO y PssP (Marczak *et al.*, 2013). Además de esta proteína implicada en la exportación de EPS, encontramos otros 15 genes más que actúan como transportadores de distintas moléculas, entre los cuales 11 son transportadores de tipo ABC de azúcares, aminoácidos, nitrato/sulfonato y glicerol 3-fosfato, entre otros. Además de los transportadores ABC, hay una proteína (RHE\_CH00209) codificada dentro de un largo operón de genes (RHE\_CH00202-RHE\_CH00211), muy conservado en Rhizobiales, con posible implicación en la formación y secreción de pili. Estos datos indican que el c-di-GMP podría estar regulando a nivel transcripcional el transporte de diversas sustancias a través de la membrana celular.

Entre los genes que aparecieron reprimidos con altos niveles de c-di-GMP, cabe destacar varios implicados en funciones de señalización y transducción de señales como RHE\_CH03146 que codifica una histidina quinasa, RHE\_PE00177 que codifica para una hipotética adenilato ciclasa que sintetiza el segundo mensajero AMPc y el gen RHE\_CH01385 (*relA*) implicada en la formación de la “alarmona” ppGpp (Kalia *et al.*, 2013). Otro dato llamativo fue encontrar un gen de fijación de nitrógeno *nifN*, reprimido en presencia de c-di-GMP. Este gen se encuentra en el plásmido simbiótico p42d y su producto NifN está implicado en la formación del cofactor FeMoCo de la nitrogenasa (Aguilar *et al.*, 1987). Varios reguladores transcripcionales también han aparecido expresados diferencialmente, RHE\_CH00496 de la familia GntR, RHE\_CH03153 de tipo AraC, RHE\_PC00134 de la familia Cro/CI y RHE\_CH00695 (*aglR*) de tipo LacI.

Entre los 10 genes que aparecieron regulados positivamente en respuesta a elevados niveles de c-di-GMP, encontramos 3 proteína hipotéticas: RHE\_CH00410

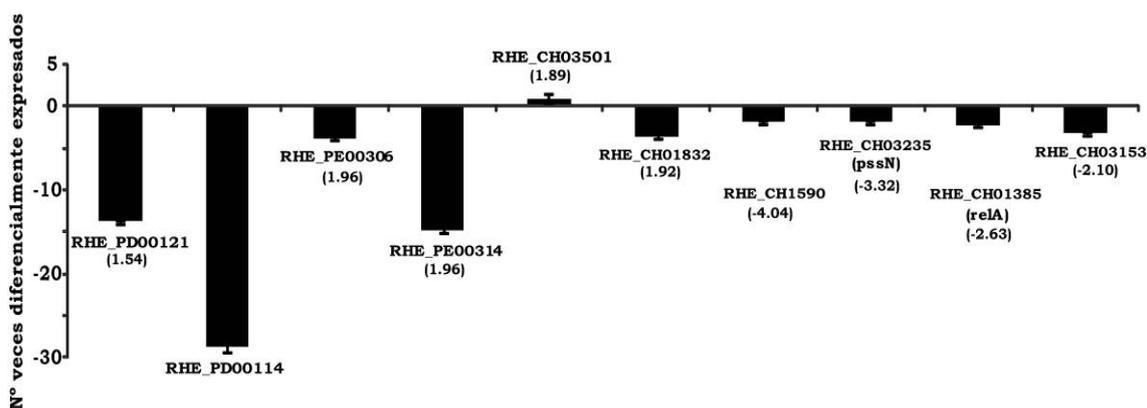
(que podría actuar como endonucleasa), RHE\_CH03841 (posible glicosil hidrolasa) y RHE\_CH01246 (de función desconocida), además de una transposasa (RHE\_PA00137), que no arrojan información significativa acerca de la regulación transcripcional por c-di-GMP en *Ret*. Sin embargo, cabe resaltar la presencia de 3 genes implicados en el transporte de moléculas a través de las envueltas celulares, RHE\_CH00492 y RHE\_CH02752, que codifican para transportadores de tipo ABC y RHE\_CH01832 que presenta dominios SecD\_SecF y podría estar implicada en el transporte de alguna sustancia, por lo que de nuevo se refuerza la idea de la regulación por c-di-GMP del tráfico de moléculas a través de la membrana. Los tres genes restantes que aparecieron como inducidos en presencia de c-di-GMP fueron RHE\_CH03501, un gen bastante conservado en rizobios que presenta un dominio PhzF (IPR003719; (Blankenfeldt *et al.*, 2004), característico de la proteína PhzF de *P. fluorescens* implicada en la biosíntesis de fenazinas; RHE\_PB00081, anotado como *thiO* y con posible implicación en la síntesis de tiamina; y RHE\_PD00121 que codifica para una posible enzima bifuncional RibBA, con actividades 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (DHBP) sintasa y GTP ciclohidrolasa II, que cataliza los primeros pasos de la síntesis de riboflavina. En *S. meliloti*, esta vitamina juega un papel importante durante la colonización de las raíces de alfalfa (Yurgel *et al.*, 2014).

Los *microarrays* deben de ser validados por una tecnología independiente. Para ello, se seleccionaron algunos de los genes con expresión diferencial identificados en el *microarray*, y tras una nueva extracción de ARN en las mismas condiciones de cultivo y una posterior síntesis de ADNc mediante reverso transcripción, se procedió a comprobar la expresión génica mediante PCR en tiempo real.

Como representantes de genes inducidos en altas concentraciones intracelulares de c-di-GMP, se eligieron los genes RHE\_PD00121 y RHE\_PD00114. Este último no apareció en los *microarrays*, pero junto con RHE\_PD00121 podría formar parte de un operón implicado en la biosíntesis de riboflavina exclusivo de la especie *R. etli* y otros simbiontes de judía como *R. tropici* y *R. gallicum*. También se escogieron los genes RHE\_CH03501 y RHE\_CH01832, ambos muy conservados en *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Agrobacterium*. Además se escogieron los genes RHE\_PE00306 y RHE\_PE00314, que aparecieron inducidos en dos de las tres réplicas realizadas. Ambos

genes forman parte de un operón posiblemente implicado en la formación de estructuras tipo pili.

Los genes escogidos entre los reprimidos por altos niveles de c-di-GMP fueron RHE\_CH01590 (*hrm*) que codifica para una proteína de unión al ADN tipo histona que se encuentra muy conservada en bacterias, RHE\_CH03235 (*pssN*) que codifica una proteína que interviene en el transporte de EPS y es exclusiva del género *Rhizobium*, el gen RHE\_CH01385 (*relA*) cuyo producto cataliza la formación de ppGpp, y por último RHE\_CH03153 que codifica un regulador transcripcional, y que podría formar operón con el gen RHE\_CH03154 que también apareció como reprimido por c-di-GMP en los experimentos con *microarrays*, y que codifica para un posible transportador del tipo MFS (Major Facilitator Superfamily).



**Figura 2.14. Determinación, mediante RT-PCR, de la expresión diferencial de algunos genes en respuesta a altos niveles de c-di-GMP.** Se emplearon las cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km y Ret  $\Delta$ celAB Tn7Km crecidas en las mismas condiciones que para los experimentos con *microarrays*, para la extracción del ARN y posterior reverso transcripción. Se indican los genes seleccionados y entre paréntesis se muestra el valor de Z-score medio que se obtuvo en los experimentos con *microarrays*. Las barras indican la media de tres réplicas biológicas.

En la figura 2.14 se observa que de los seis genes elegidos entre los que aparecieron sobreexpresados en altos niveles de c-di-GMP, solo el gen RHE\_CH03501 se confirmó mediante RT-PCR, aunque los niveles de cambio no fueron muy elevados. Por el contrario, el resto de genes mostraron una significativa reducción de sus niveles de transcritos en presencia de altos niveles de c-di-GMP, resultado que contradecía los datos obtenidos con *microarrays*.

Por otro lado, los cuatro genes elegidos entre los reprimidos fueron todos confirmados mediante esta técnica independiente, mostrando en todos los casos unos

## Capítulo II

---

valores de disminución de transcritos similares a los obtenidos en los *microarrays* (Fig. 2.14). Así pues, los altos niveles de c-di-GMP estarían principalmente reduciendo la expresión de un número limitado de genes, muchos de ellos implicados en transporte de sustancias a través de las membranas celulares.

---

## **DISCUSIÓN CAPÍTULO II**

Como se ha descrito en el capítulo I, el incremento artificial de los niveles de c-di-GMP por la sobreexpresión de la DGC PleD\* en diferentes bacterias que interactúan con plantas, provoca una serie de cambios fenotípicos en vida libre como son la inhibición de distintos tipos de motilidad, el incremento de la producción de EPS, de la formación de biopelículas y de la floculación bacteriana. Estas alteraciones causadas por altos niveles intracelulares de c-di-GMP generan, además, un fuerte impacto en la interacción con la planta hospedadora. De esta manera, y de forma general, por un lado parecen verse favorecidas las etapas iniciales de la interacción (adhesión), mientras que la eficiencia simbiótica se ve perjudicada (Pérez-Mendoza *et al.*, 2014). Entre las interacciones estudiadas, la interacción simbiótica más afectada fue la de *R. etli* (Ret)-*P. vulgaris* (judía), por lo que en este capítulo hemos abordado un estudio más detallado de esta interacción. Además, la sobreproducción de EPS fue uno de los fenotipos en vida libre más destacados en presencia de elevados niveles de c-di-GMP, siendo además los EPS unas macromoléculas cruciales en las interacciones rizobio-leguminosa (Becker *et al.*, 2002; Fraysse *et al.*, 2003).

Ret puede producir al menos tres EPS diferentes cuya síntesis en otras bacterias está regulada por el segundo mensajero c-di-GMP: celulosa, MLG y UPP. La regulación alostérica por c-di-GMP de la producción de celulosa es bien conocida en numerosas bacterias (Fujiwara *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2014; Omadjela *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 1987). Además en bacterias filogenéticamente cercanas a Ret como *R. leguminosarum* (Rle) y *A. tumefaciens* (Atu), las DGC homólogas a PleD, CelR2 y CelR respectivamente, son las encargadas de suministrar el c-di-GMP a la celulosa sintasa activando la producción de celulosa (Ausmees *et al.*, 1999; Barnhart *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que en *R. etli* la regulación de la celulosa sintasa es similar a la mayoría de bacterias, activada por c-di-GMP.

En cuanto al MLG producido por *R. etli*, se pudo comprobar que su estructura es igual al de *S. meliloti* 8530 (total alternancia de enlaces  $\beta$  (1-3) y  $\beta$  (1-4)). Además, estudios de expresión revelaron una discreta regulación transcripcional a través del c-di-GMP del operón *bgsAB*, por lo que la activación de este nuevo EPS por diguanilato cíclico estaría principalmente regulada a nivel posttranscripcional, probablemente por la

unión del c-di-GMP al dominio C-terminal de BgsA, como ocurre en *S. meliloti* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015).

La regulación por c-di-GMP del UPP en *Atu* ha sido descrita recientemente (Xu *et al.*, 2013), por lo que su estudio en *Ret* no estuvo entre los objetivos iniciales de esta tesis doctoral. Sin embargo, los genes encargados de la síntesis del UPP o glucomanano se encuentran muy conservados en bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Mesorhizobium*. Por el contrario, estos genes no están presentes en otros patógenos de animales pertenecientes al orden Rhizobiales, como *Brucella*. Por este motivo, se ha sugerido que el UPP solamente jugaría un papel en aquellas bacterias que interactúan con plantas (Williams *et al.*, 2008). Además de los mecanismos de su probable regulación por c-di-GMP, por el momento desconocidos, será también de interés explorar si el UPP producido por distintas bacterias tiene la misma estructura en todas ellas (Pérez-Mendoza & Sanjuán, 2016).

Las colonias de *A. tumefaciens* cuando sobreexpresan la DGC PleD nativa, se tiñen con CR debido a la sobreproducción de celulosa y UPP, y ambos EPS son los responsables de dicha tinción, por lo que mutantes para uno u otro EPS siguen formando colonias rojas en dichos medios (Xu *et al.*, 2013). En el caso de *Ret*, la caracterización fenotípica de los distintos mutantes para celulosa, MLG o ambos, indicó que, en presencia de altos niveles de c-di-GMP, la celulosa y el MLG son los EPS que mayoritariamente contribuyen a los fenotipos CR<sup>+</sup> y CF<sup>+</sup>. Ambos EPS contribuyen de forma sinérgica, y solo la pérdida de ambos EPS provoca la incapacidad de formar colonias rojas en presencia de CR, o fluorescentes en presencia de CF. Aunque tal y como se ha indicado anteriormente en esta tesis no se ha estudiado la regulación de la producción de UPP en *Ret*, el fenotipo CR<sup>-</sup> observado en el doble mutante bajo altos niveles de c-di-GMP (*Ret* ΔΔ Tn7pleD\*Km), indica la ausencia de producción significativa de UPP bajo las condiciones ensayadas, o bien que se produce UPP con una estructura diferente, lo que explicaría la ausencia de tinción con CR. Sin embargo, el incremento de 2.5 veces en la fluorescencia por CF del doble mutante con altos niveles de c-di-GMP (*Ret* ΔΔ Tn7pleD\*Km) en relación a la cepa silvestre, apunta a la existencia de uno o varios EPS adicionales, cuya producción también estaría estimulada por c-di-GMP.

El uso de diferentes mutantes de Ret nos han permitido determinar los EPS responsables de determinados fenotipos observados en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Así hemos podido determinar que la celulosa es el principal EPS implicado en la formación de flóculos por Ret en respuesta a un incremento de los niveles de c-di-GMP. Este EPS es secretado en forma de microfibrillas en *Rhizobium* y *Agrobacterium*, emergiendo desde distintos puntos de la superficie bacteriana, generando un entramado que engloba las bacterias y permite la formación de flóculos de diferentes tamaños (Deinema & Zevenhuizen, 1971; Matthyse, 1983). Además de la formación de flóculos, el incremento de la producción de EPS por altos niveles de c-di-GMP da lugar a un aumento de la capacidad de formación de biopelículas. La construcción de mutantes en celulosa y MLG nos ha permitido concluir que la celulosa estaría implicada en la adhesión de Ret a superficies abióticas (poliestireno) en presencia de elevadas concentraciones de c-di-GMP, mientras que el MLG no tendría un papel relevante, al menos en las condiciones ensayadas. Es de destacar que en *A. tumefaciens* la floculación y formación de biopelículas inducidas por c-di-GMP es debida a la producción de ambos polisacáridos, celulosa y UPP (Xu *et al.*, 2013). En el caso de *S. meliloti* 2011, que carece de celulosa y tampoco produce MLG (por ser  $\text{ExpR}^-$ ), los aumentos en la agregación y formación de biopelículas debidos a altos niveles de c-di-GMP parecen ser debidos principalmente al UPP (Schäper *et al.*, 2016). Nuestros resultados sugieren de nuevo que la regulación y/o la estructura del UPP de Ret pueden ser diferentes, ya que no parece haber una producción significativa de UPP en presencia de altos niveles de c-di-GMP. Aunque también pudiera ser debido a la interacción con otros EPS. Por ejemplo, en *Sme* 2011 el UPP parece tomar más protagonismo en ausencia de producción de EPSI y EPSII (Schäper *et al.*, 2016). Alternativamente, también existe la posibilidad de que las diferencias entre *R. etli* y otras bacterias como *A. tumefaciens* sean debidas a la fuente productora de c-di-GMP. Diversos autores han observado que no existe una correlación directa entre niveles de c-di-GMP e intensidad de expresión de ciertos fenotipos, así como que la expresión fenotípica puede variar dependiendo de la DGC productora del c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). Por ejemplo, tanto en la cepa 1021 ( $\text{ExpR}^-$ ) como en la cepa 8530 ( $\text{ExpR}^+$ ) de *Sme*, el c-di-GMP producido por la DGC PleD\* no permite la visualización de la formación de UPP; sin

embargo la producción de este UPP parece muy evidente en la cepa 2011 (ExpR) sobreexpresando la proteína PleD nativa (Schäper *et al.*, 2016).

Por otro lado, la celulosa, pero no el MLG, contribuye parcialmente a la adhesión de Ret a raíces de judía, pues tanto el mutante en celulosa como el doble mutante Cel<sup>-</sup>MLG<sup>-</sup>, a pesar de ser significativamente menos competitivos que la cepa parental, aun presentan una importante capacidad de unión a raíces de judía. Estos resultados contrastan con los observados en Sme 8530, bacteria en la que, en ausencia de celulosa, el MLG toma protagonismo en la adhesión a las raíces de alfalfa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Nuestros resultados sugieren que *R. etli*, tanto en niveles fisiológicos como elevados de c-di-GMP, utiliza otros componentes, además de la celulosa o el MLG, para adherirse a raíces de judía.

En los rizobios y en otra bacterias se ha propuesto un modelo de interacción con las raíces de sus plantas hospedadoras en dos etapas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Una etapa inicial, de unión débil y reversible mediada por polisacáridos de superficie, adhesinas bacterianas dependientes de calcio (rhicadesinas) y por lectinas de la planta (Smit *et al.*, 1987) . No obstante, los genes para rhicadesinas no han sido todavía identificados, en cambio se han descrito las proteínas Rap, que en realidad son un tipo de lectina pues unen específicamente carbohidratos (Abdian *et al.*, 2013; Ausmees *et al.*, 2001a). En esta etapa participaría el glucomanano o UPP, el único EPS de Rle capaz de unir las lectinas de guisante y veza en condiciones ligeramente ácidas (Laus *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008). En una segunda etapa, se establecería una adhesión más fuerte e irreversible, en la que intervendrían EPS como la celulosa, a través de la formación de agregados en el extremo de los pelos radicales o *cap formation* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007; Smit *et al.*, 1992). En Sme, que no produce celulosa, el MLG participa en la adhesión de esta bacteria a raíces de alfalfa, aunque no se ha descrito en qué etapa participa (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015).

Además, los rizobios han desarrollado dos estrategias adaptativas para poder adherirse a las raíces de leguminosas dependiendo del pH del medio. En condiciones ácidas, el mecanismo que predomina es el mediado por lectinas de la planta y el glucomanano, mientras que en condiciones alcalinas el mecanismo de adhesión predominante sería a través de las ricadesinas (Laus *et al.*, 2006). En nuestras condiciones experimentales (pH 7.5), la participación del glucomanano en la adhesión a

---

raíces de judía estaría limitada, sugiriendo la implicación de ricadhesinas u otros mecanismos de adhesión en Ret.

Con el objetivo de analizar el papel de los EPS celulosa y MLG durante la interacción simbiótica Ret-judía, se llevaron a cabo ensayos de infectividad de plantas en jarras Leonard. Debido al espacio y tiempo requerido por los ensayos de plantas, se decidió ensayar las cepas de Ret delecionadas en el operón de la celulosa y el doble mutante con y sin PleD\*. Con niveles fisiológicos de c-di-GMP, la ausencia de los EPS celulosa y MLG no tuvo ningún efecto significativo sobre la interacción simbiótica Ret-judía. En otras bacterias relacionadas filogenéticamente a Ret, mutantes en los genes *cel*, tampoco presentan alteraciones en su interacción con la planta. Así en Rle, la celulosa no es esencial para el establecimiento de una correcta simbiosis pero si interviene en la formación de biopelículas en el extremo de pelos radicales o *cap formation* (Laus *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 1987). En el fitopatógeno Atu, la celulosa no interviene en la virulencia de esta bacteria, ya que mutantes incapaces de producir celulosa (*cel*), son igual de virulentos que la cepa silvestre (Matthysse, 1983). De forma contraria, mutantes de Rle y Atu que sobreproducen celulosa, ven incrementada la adhesión a sus respectivas plantas hospedadoras a través de la formación de densos agregados, mientras que la capacidad de nodulación (Rle) o de producir tumores (Atu) permanece intacta (Matthysse *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 1987).

En condiciones de elevados niveles de c-di-GMP, como se describió en el capítulo anterior, la eficiencia simbiótica de *R. etli* se ve seriamente deteriorada. La ausencia de celulosa parece permitir una recuperación tanto en el número de nódulos como en el contenido de nitrógeno de la planta, en comparación con la cepa parental Ret Tn7pleD\*Km. La simbiosis formada por el doble mutante también permitió una ligera recuperación en el contenido en nitrógeno de la planta, alcanzando unos valores intermedios entre el mutante *Cel*<sup>-</sup> y la cepa parental. Estos datos sugieren que la pérdida de los EPS celulosa y MLG suponen una ventaja simbiótica en un contexto de elevadas concentraciones de c-di-GMP. En consecuencia, al menos parte del efecto negativo de los altos niveles de c-di-GMP serían debidos a cambios en la bacteria distintos de la sobreproducción de celulosa y MLG.

Con el objetivo de determinar el papel de los EPS celulosa y MLG en presencia de niveles fisiológicos y elevados de c-di-GMP durante las etapas posteriores de la

interacción Ret-judía, se analizó la morfología microscópica de nódulos infectados por las cepas de Ret delecionadas en el operón de la celulosa y del doble mutante. En aquellos nódulos infectados por cepas que no expresan *pleD\**, la ausencia de celulosa y MLG no producía ninguna alteración evidente de la morfología ni el desarrollo nodular. Sin embargo, en presencia de elevados niveles de c-di-GMP, la mayor parte de los nódulos de la cepa parental Ret Tn7*pleD\**Km presentaban menor cantidad de células vegetales infectadas, que además se localizaban formando grupos o lóbulos rodeados de células no infectadas. Esta situación estaba ligeramente acentuada en el mutante en celulosa, pero fue mucho más evidente en el doble mutante, en cuyos nódulos se observaron grupos aislados de células infectadas. Estas anomalías hacen pensar en una posible alteración en el patrón de infección que provocaría un retraso en la invasión de las células corticales del nódulo.

La invasión de las células vegetales del nódulo por parte de los rizobios comienza con la formación de un canal de infección; una estructura tubular formada por la invaginación de la pared y la membrana plasmática de la célula vegetal en donde las bacterias se dividen (Gage, 2002). El canal de infección atraviesa el citoplasma de las células del córtex a través de unos puentes citoplasmáticos y se va ramificando a la vez que se adentra en el primordio nodular, para asegurar un mayor número de células infectadas (Gage, 2004; Monahan-Giovanelli *et al.*, 2006). Una vez liberadas las bacterias en el citoplasma en un proceso que semeja la endocitosis, estas comienzan a diferenciarse en bacteroides fijadores de nitrógeno. Las alteraciones observadas en los nódulos infectados por los mutantes en celulosa y MLG en presencia de elevados niveles de c-di-GMP podrían ser explicados por una inadecuada o insuficiente ramificación de los canales de infección, lo que se traduciría en una distribución sectorizada de las células infectadas. Las alteraciones más graves presentadas por el doble mutante indicarían un papel del MLG durante la formación de los canales de infección o en etapas posteriores de colonización y desarrollo del nódulo. No obstante, son necesarios más estudios microscópicos, particularmente con nódulos de distinta edad y nivel de desarrollo, empleando además las cepas mutantes en *bgsA*, para determinar con mayor certeza las alteraciones observadas.

Nuestros datos indican que la sobreproducción de celulosa y MLG en respuesta a elevados niveles de c-di-GMP, no son los únicos responsables de la menor eficiencia

---

simbiótica observada en la cepa Ret Tn7pleD\*Km, sugiriendo que el c-di-GMP podría estar causando otros efectos en la bacteria que determinan una menor capacidad de nodulación, infección y eficiencia simbiótica. Con el objetivo de determinar cambios en la expresión génica provocados por altos niveles de c-di-GMP, realizamos un estudio transcriptómico empleando las cepas Ret  $\Delta$ celAB Tn7pleD\*Km y Ret  $\Delta$ celAB Tn7Km para facilitar su manejo evitando la formación de flóculos. Se obtuvieron un total de 77 genes diferencialmente expresados, de los cuales 10 se encontraban sobreexpresados y 67 reprimidos. Tomados globalmente, los datos indican que i) el c-di-GMP no altera la expresión de numerosos genes en Ret, por lo que su principal vía de actuación podría ocurrir a nivel postranscripcional, y ii) los altos contenidos de c-di-GMP tienden a reprimir, más que activar, la expresión génica. Los genes diferencialmente expresados por c-di-GMP, aun siendo un número relativamente pequeño, pertenecen a diversas categorías funcionales. Solo se pudo constatar una particular abundancia de genes implicados en transporte de diferentes moléculas. No obstante, estos datos deben ser tomados con cautela puesto que la expresión diferencial de un buen número de genes en presencia de alto c-di-GMP, no pudo ser corroborada mediante experimentos de RT-PCR.

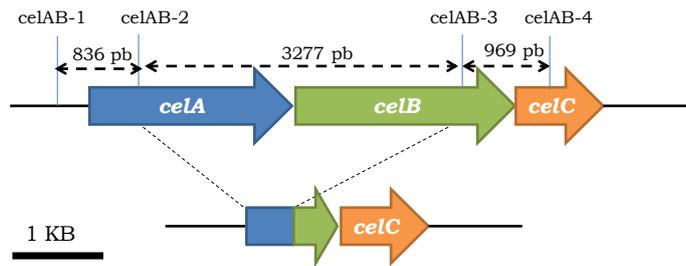
## **ANEXOS CAPÍTULO II**

### **2.1. Construcción del mutante *celAB* de *Rhizobium etli* CFN42**

Para la obtención de cepas incapaces de producir el polisacárido celulosa, se decidió delecionar los genes *celAB*, ya que son los encargados de codificar las subunidades catalíticas de la celulosa sintasa. Para ello, se empleó una PCR solapante, que consistió en la amplificación en 2 etapas. En primer lugar, a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *R. etli* CFN42, con los oligonucleótidos *celAB*-1 y *celAB*-2, se amplificó una región de 836 pb aguas arriba de la zona a delecionar. Con los oligonucleótidos *celAB*-3 y *celAB*-4, se amplificó una región de 969 pb aguas abajo de la región a delecionar. A continuación, empleando como ADN molde los dos productos anteriores y usando los oligonucleótidos *celAB*-1 y *celAB*-4 se llevó a cabo otra reacción de PCR, obteniendo como resultado una delección de 3277 pb de los 4680 pb que conforman la suma de los genes *celA* y *celB* (Fig. A2.1).

*celAB*-1: 5' AATCGGCAAGAGCAATCG 3'  
*celAB*-2: 5' ATGGCGTCCGACGGCAATGAGTTCGC 3'  
*celAB*-3: 5' ATTGCCGTCCGACGCCATCTTCATCGG 3'  
*celAB*-4: 5' GTGCGGCTTGATGTTGG 3'

El producto de PCR de 1.8 Kb se clonó en el vector pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> dando lugar al vector TOPOΔ*celAB*. Tras mandar a secuenciar y comprobar que no había errores en la secuencia, el fragmento de 1.9 Kb obtenido de la digestión con las enzimas *Xba*I y *Hind*III se subclonó en el plásmido suicida pK18*mobsacB*, obteniendo el vector pK18Δ*celAB*. Esta construcción se transfirió a *R. etli* CFN42 mediante conjugación biparental empleando la cepa S17.1 de *E. coli* para la obtención de mutantes delecionados en los genes *celAB* mediante intercambio alélico. Al tratarse de un vector suicida no puede replicarse en *Rhizobium*, por lo que tras producirse un doble intercambio alélico se seleccionaron colonias Km sensibles, que portaban la delección y además carecían del vector. Para ello se empleó la sensibilidad a sacarosa que confiere el gen *sacB* del vector pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994).



**Figura A2.1. Esquema representativo de la delección del operón de la celulosa.** En la imagen superior encontramos la organización de los genes que componen parte del operón de la celulosa, los oligonucleótidos empleados, así como los fragmentos obtenidos mediante PCR, aguas arriba y aguas abajo del fragmento eliminado. En la imagen inferior se representa la delección generada en los genes *celAB* de *R. etli* CFN42 tras el intercambio alélico.

La delección fue comprobada mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos *celAB-1* y *celAB-4*, detectándose un fragmento esperado de 1805 pb, frente a los 5082 en la cepa silvestre.

## **2.2. Construcción del mutante *bgsA* de *Rhizobium etli* CFN42**

Para la obtención de cepas incapaces de producir MLG, se decidió deleccionar el gen RHE\_PE00363 (*bgsA*), que codifica para la glicosiltransferasa implicada en su síntesis.

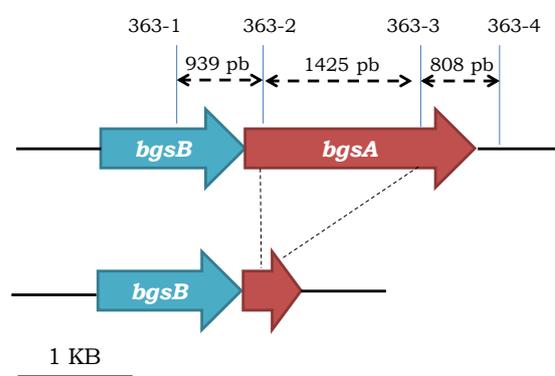
En primer lugar, a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *R. etli* CFN42, con la pareja de oligonucleótidos 363-1 y 363-2, se amplificó una región de 939 pb aguas arriba de la zona a deleccionar. Con los oligonucleótidos 363-3 y 363-4, se amplificó una región de 808 pb aguas abajo de la región a deleccionar. A continuación, empleando como ADN molde los dos productos anteriores y usando los oligonucleótidos 363-1 y 363-4 se llevó a cabo la segunda reacción de PCR, obteniendo como resultado una delección de 1425 pb de los 1992 pb totales que tiene el gen *bgsA* (Fig. A2.2).

363-1: CGACGGACAGAATGACG  
 363-2: TCGTTGGGTCAGTTCACGCTTGTCGC  
 363-3: CGTGAAGTACCCAACGACGAAGCAG  
 363-4: TACGGTTGCTGCGACAC

El producto de PCR de 1.7 Kb se clonó en el vector pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO<sup>®</sup> dando lugar al vector TOPOΔ*bgsA*. Tras mandar a secuenciar y comprobar que no había

errores en la secuencia, el fragmento de 1.8 Kb obtenido de la digestión con las enzimas XbaI y HindIII se subclonó en el plásmido suicida pK18*mobsacB*, obteniendo el vector pK18Δ*bgsA*. Esta construcción se transfirió a *R. etli* CFN42 mediante conjugación biparental empleando la cepa S17.1 de *E. coli* para la obtención de mutantes delecionados en el gen *bgsA* mediante intercambio alélico.

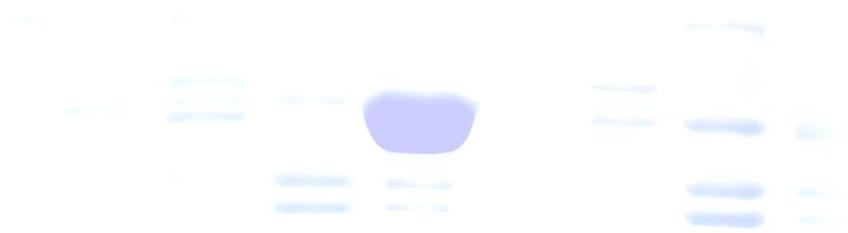
La deleción fue comprobada mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos 363-1 y 363-4, detectándose el fragmento esperado de 1729 pb, frente al de 3172 de la cepa silvestre.



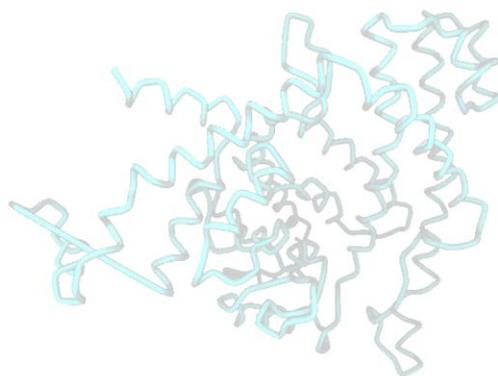
**Figura A2.2. Esquema representativo de la deleción del gen *bgsA*.** En la imagen superior encontramos la organización de los genes que componen el operón del glucano de enlaces mixtos (MLG), los oligonucleótidos utilizados, así como los fragmentos obtenidos mediante PCR, aguas arriba y aguas abajo del fragmento génico eliminado. En la imagen inferior se representa la deleción del gen *bgsA* de *R. etli* CFN42 tras el intercambio alélico.

### **2.3. Construcción del doble mutante *celAB* /*bgsA* (ΔΔ) de *Rhizobium etli* CFN42**

Para la obtención de cepas que fueran incapaces de producir tanto el polisacárido celulosa como el glucano de enlaces mixtos, se introdujo el vector suicida pK18Δ*bgsA* en el fondo genético Ret Δ*celAB* mediante conjugación biparental con la cepa S17.1 de *E. coli*. Tras el intercambio alélico se comprobó mediante PCR que dicha cepa era portadora de las dos deleciones.



## **CAPÍTULO III**





### **3. Identificación y caracterización de proteínas de *Rhizobium etli***

#### **CFN42 capaces de unir c-di-GMP**

En la mayoría de genomas de bacterias que interactúan con plantas, es posible identificar, por procedimientos bioinformáticos, un gran número de proteínas con dominios GGDEF y EAL o HD-GYP, hipotéticas diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDE), respectivamente, teóricamente implicadas en el metabolismo (síntesis y degradación) del segundo mensajero c-di-GMP. Esto contrasta con el reducido número de hipotéticas proteínas efectoras, capaces de unir c-di-GMP, que esos mismos procedimientos bioinformáticos pueden reconocer. En un símil utilizado por U. Römling y colaboradores (2013), la situación se asemeja a la de un ejército disfuncional en el que existen más oficiales dando órdenes (las enzimas que producen o degradan el c-di-GMP), que soldados (las moléculas efectoras del c-di-GMP) ejecutando dichas órdenes. Este hecho, junto con las múltiples y variadas funciones controladas por el c-di-GMP, lleva a pensar que la mayoría de efectores del c-di-GMP todavía están por identificarse y caracterizarse.

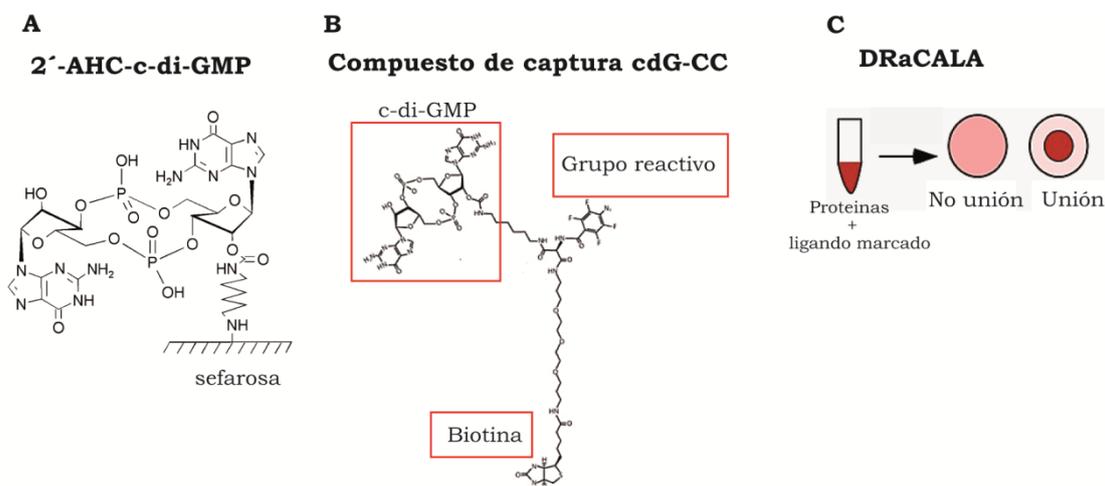
Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis doctoral, entre las moléculas efectoras conocidas, capaces de responder a cambios en los niveles intracelulares de c-di-GMP, se encuentran: i) proteínas con dominios PilZ (Amikam & Galperin, 2006; Ryjenkov *et al.*, 2006), ii) enzimas con dominios GGDEF o EAL degenerados (Duerig *et al.*, 2009) entre los que se podría incluir igualmente el recientemente descubierto dominio GIL en la proteína BcsE (Fang *et al.*, 2014), iii) diferentes factores transcripcionales (Hickman & Harwood, 2008) y iv) las regiones no codificantes de algunos ARN mensajeros, que presentan la capacidad de unir c-di-GMP directamente en lo que se conoce como *riboswitches* o ribointerruptores (Hengge, 2010; Sudarsan *et al.*, 2008).

Las interacciones del c-di-GMP con moléculas de naturaleza tan variada son indicativas de la gran flexibilidad operativa de este mensajero, lo que le permite controlar funciones celulares a diferentes niveles: transcripcional, post-transcripcional y post-traduccionales. El c-di-GMP es capaz de regular la expresión génica, bien uniéndose a reguladores transcripcionales o bien uniéndose directamente a moléculas de ARN. Además, es capaz de controlar la actividad enzimática de determinadas proteínas, uniéndose directamente a ellas o uniéndose a proteínas coadyuvantes de la función

catalítica. Por otro lado, los dominios que unen c-di-GMP no están tan conservados como los dominios de las enzimas metabólicas, por lo que su búsqueda bioinformática se dificulta (Fang *et al.*, 2014). Todo esto complica la búsqueda e identificación de nuevos efectores celulares para el c-di-GMP.

### **3.1. Metodología para la identificación de efectores celulares de c-di-GMP**

Hasta el momento solo hay unos pocos trabajos centrados en la búsqueda de nuevas proteínas efectoras de forma masiva. Cada método emplea diferentes moléculas para la captura e identificación de proteínas efectoras, como pueden ser análogos del c-di-GMP marcados o sin marca y compuestos basados en el c-di-GMP con alguna modificación para facilitar la recuperación de las proteínas capturadas. Dependiendo de la molécula empleada se van a obtener distintos subconjuntos de proteínas, lo que sugiere una alta variabilidad de resultados, por lo que es obligatorio el uso de técnicas independientes para corroborar las posibles proteínas efectoras identificadas. A continuación se describen detalladamente las tres principales metodologías descritas hasta el momento:



**Figura 3.1. Diferentes estrategias empleadas en la búsqueda de proteínas efectoras que unen c-di-GMP.** A) Técnica descrita por Düvel *et al.*, basada en una cromatografía de afinidad empleando el análogo 2'-AHC-c-di-GMP (Biolog) unido covalentemente a sefarosa. B) Se emplea un compuesto tri-funcional (cdG-CC) con grupos que presentan diferentes propiedades (afinidad, reactividad y aislamiento) para la captura de proteínas efectoras (Nesper *et al.*, 2012). C) Representación esquemática del principio de DRaCALA (Roelofs *et al.*, 2011), donde la unión del ligando marcado a la proteína presenta una señal diferente a cuando no hay una unión específica y el ligando marcado se moviliza por capilaridad.

### **3.1.1. Cromatografía de afinidad: análogo del c-di-GMP acoplado a sefarosa**

Uno de los primeros trabajos centrado en la búsqueda de efectores fue el de Düvel y colaboradores (Düvel *et al.*, 2012), quienes describieron un método de cromatografía de afinidad que emplea un análogo del c-di-GMP acoplado a sefarosa (2'-aminohexilcarbamoil-c-di-GMP, 2'-AHC-c-di-GMP), para el aislamiento de proteínas capaces de unir c-di-GMP (Fig. 3.1A). Para la identificación de las proteínas se utilizó espectrometría de masas. De esta forma se consiguieron identificar 128 posibles proteínas efectoras, entre las que se encontraban 3 proteínas con dominios PilZ, 9 proteínas con dominios GGDEF y/o EAL y una proteína con dominio HD-GYP (Düvel *et al.*, 2012).

### **3.1.2. Cromatografía de afinidad: Compuesto trifuncional**

Casi al mismo tiempo, el laboratorio de Urs Jenal (Basilea, Suiza) describió una nueva aproximación para la búsqueda de proteínas efectoras en los patógenos *P. aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar typhimurium (Nesper *et al.*, 2012). Esta técnica se basa en el empleo de un compuesto tri-funcional (cdG-CC) que presenta diferentes propiedades reactivas (Fig. 3.1B). El compuesto estaría formado por una molécula de c-di-GMP para la captura de proteínas específicas; a continuación, un grupo sensible a la radiación ultravioleta (UV) que forma nitreno altamente reactivo, dando lugar a la formación de enlaces covalentes en la proteína unida a la molécula de c-di-GMP. Por último, un grupo biotina facilita el aislamiento de las proteínas capturadas mediante esferas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Fig. 3.1B). Tras espectrometría de masas, en *P. aeruginosa* se identificaron 65 posibles proteínas efectoras, entre las cuales encontraron 4 proteínas con dominios PilZ, 6 proteínas con dominios GGDEF y/o EAL y el regulador transcripcional FleQ (Nesper *et al.*, 2012). Posteriormente, esta técnica ha sido empleada con éxito para la búsqueda de proteínas efectoras en otras especies como *P. fluorescens* SBW25 (Trampari *et al.*, 2015), el depredador *B. bacteriovorus* (Rotem *et al.*, 2016) o en el actinomiceto *Streptomyces venezuelae* (Tschowri *et al.*, 2014).

En comparación con el trabajo de Düvel y colaboradores, solo se encontraron 11 proteínas coincidentes en ambos trabajos, de las cuales 6 eran proteínas con dominios GGDEF o PilZ.

### 3.1.3. Rastreo de proteínas efectoras mediante DRaCALA

Otro trabajo que describe la búsqueda de proteínas efectoras de forma masiva en *E. coli*, es el presentado por Fang y colaboradores, quienes utilizaron la técnica DRaCALA (Differential Radial Capillarity Action of Ligand Assay) para rastrear posibles proteínas efectoras en una librería que sobreexpresa todas las proteínas codificadas en el genoma de *E.coli* (Fang *et al.*, 2014). DRaCALA se basa en la menor difusión de pequeños ligandos en membranas de nitrocelulosa, cuando estos se encuentran unidos a proteínas efectoras. Si hay unión entre un ligando fluorescente o marcado radiactivamente y una proteína, al colocar la mezcla de ambos sobre un filtro de nitrocelulosa, estos se van a localizar justo donde se han depositado, sin embargo, si no existe unión, el ligando va a difundir por capilaridad junto con la fase líquida (Roelofs *et al.*, 2011) (Fig. 3.1C). Con esta rápida y sencilla técnica, pudieron identificar tres proteínas efectoras en *E. coli*, entre las que se encontraba BcsE. Esta proteína es necesaria para la máxima producción de celulosa en esta bacteria. En este trabajo identificaron en BcsE un nuevo dominio capaz de unir c-di-GMP al que llamaron GIL (GGDEF I-site like domain), ya que estructuralmente se asemeja al sitio I (inhibitorio) de las diguanilato ciclasas (DGC).

Tanto los métodos de captura por afinidad como DRaCALA presentan una serie de ventajas e inconvenientes. Aunque los métodos de captura permiten el aislamiento e identificación de efectores dentro de muestras complejas, como por ejemplo lisados bacterianos en los que los efectores se encuentran en niveles fisiológicos (no sobreexpresados), también generan muchos falsos positivos, bien mediante la unión inespecífica de las proteínas a la sefarosa (método de Düvel *et al.*) o bien mediante la captura de complejos proteicos donde solo una de las proteínas es la que une c-di-GMP (método de Nesper *et al.*). DRaCALA presenta la ventaja de que es un método muy rápido, pues permite el análisis de posibles proteínas efectoras en el proteoma de cualquier bacteria mediante estrategias de sobreexpresión sin necesidad de purificar las proteínas. No obstante, DRaCALA presenta varios inconvenientes para la identificación de efectores de forma masiva, como es la necesidad de contar con una librería genómica para la sobreexpresión de todas las proteínas codificadas en un genoma. Su uso, por tanto, es más frecuente en la corroboración de hipotéticos candidatos identificados previamente. Además, al igual que los métodos de captura, DRaCALA puede también

dar lugar a la aparición de falsos positivos y falsos negativos, sobre todo cuando se emplean análogos de c-di-GMP fluorescentes (Fang *et al.*, 2014).

Todos los posibles efectores obtenidos tanto por métodos de captura como por DRaCALA, deben de ser posteriormente corroborados por otros métodos más precisos y sensibles.

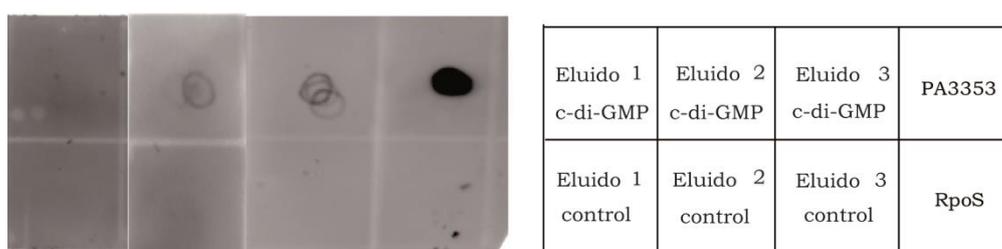
### **3.2. Cromatografía de afinidad para la búsqueda de nuevos efectores que unan c-di-GMP en *Rhizobium etli* CFN42.**

En el genoma de Ret se encuentran 3 genes que codifican para proteínas con dominios PilZ, RHE\_CH02207, RHE\_CH01767 y RHE\_CH01542 (Prada-Ramírez, 2014). Salvo RHE\_CH01542 que codifica para la celulosa sintasa Cella, cuyo dominio PilZ está documentado y caracterizado en otras especies bacterianas (Fujiwara *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2013; Omadjela *et al.*, 2013), las 2 proteínas restantes son proteínas hipotéticas de un tamaño reducido (alrededor de 100 aminoácidos), cuya función aún se desconoce. La proteína RHE\_CH01767 es homóloga (34% identidad) a McrA de Sme, por lo que podría tener un papel en la regulación de la motilidad (Schäper *et al.*, 2016). A esta lista de proteínas efectoras hay que añadir la proteína BgsA de Ret (RHE\_PE00363) descrita en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, cuya actividad se encuentra regulada por c-di-GMP a pesar de no tener un dominio PilZ consenso.

En Ret encontramos 35 proteínas con dominios GGDEF y/o EAL, de éstas, 21 son proteínas con dominios GGDEF y EAL en tándem y 14 tendrían un dominio GGDEF. Además, encontramos una proteína con dominio HD-GYP (RHE\_CH03091). Este elevado número de proteínas metabólicas del c-di-GMP contrasta con el escaso número de proteínas efectoras reconocidas. La gran variedad de funciones bacterianas controladas por el c-di-GMP, además, apunta a que deben existir nuevos y desconocidos dominios proteicos, que respondan a c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013). Por ello decidimos emprender la búsqueda de nuevas proteínas efectoras en esta bacteria que pudieran mediar en las respuestas celulares dependientes de c-di-GMP observadas en esta tesis. Para ello se empleó la metodología descrita por Düvel y colaboradores (para más información ver apartado 3.2 de la sección materiales y métodos).

Se partió de tres cultivos independientes de Ret en fase exponencial tardía ( $DO_{600}$  0.8-0.9). Tras romper las células empleando la prensa de French, los lisados se incubaron con el análogo 2'-AHC-c-di-GMP (Fig. 3.1A), unido covalentemente a esferas de sefarosa. Como control de las uniones inespecíficas a la sefarosa, en paralelo se incubaron muestras de lisados con esferas de sefarosa no modificada. Tras dos horas de incubación a 4°C y 6 lavados con tampón PBS, las proteínas fueron eluidas con c-di-GMP 100  $\mu$ M durante 40 minutos.

Como paso previo a la identificación por espectrometría de masas (LC/MS-MS), para comprobar si existía un enriquecimiento en proteínas de unión al c-di-GMP, tanto los eluidos provenientes de la sefarosa-2'-AHC-c-di-GMP, como de los respectivos controles, fueron analizados mediante ensayos de *dot-blot*, en los que alícuotas de 3  $\mu$ l de cada eluido fueron depositados como una gota sobre filtros de nitrocelulosa, para posteriormente ser incubados con el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. La fluorescencia emitida fue detectada en un escáner de fluorescencia. Como se muestra en la figura 3.2, los eluidos de los experimentos 2 y 3, pero no del 1, provenientes de la sefarosa-AHC-c-di-GMP, dieron una señal más intensa en comparación con sus respectivos controles, en los que no se observó ninguna señal fluorescente. Estos resultados indicaban que la cromatografía de afinidad empleando el análogo 2'-AHC-c-di-GMP, produjo un enriquecimiento de proteínas de Ret con capacidad de unión al c-di-GMP, al menos en dos de las tres repeticiones o muestras (eluidos) experimentales.



**Figura 3.2. Ensayos de *dot-blot*.** Los eluidos provenientes de la sefarosa-2'-AHC-c-di-GMP (fila de arriba) y sus respectivos controles (fila de abajo) fueron incubados sobre membranas de nitrocelulosa con 1  $\mu$ M del análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Como controles positivo y negativo se utilizaron las proteínas purificadas de *P. aeruginosa* PA3353 y RpoS, respectivamente. Se muestran los *dot blot* de los tres experimentos de afinidad realizados.

Una vez comprobados mediante *dot blot*, los eluidos fueron sometidos a espectrometría de masas para la identificación de las proteínas más abundantes. En la tabla 3.1 se reflejan los datos obtenidos en cada uno de los tres experimentos de

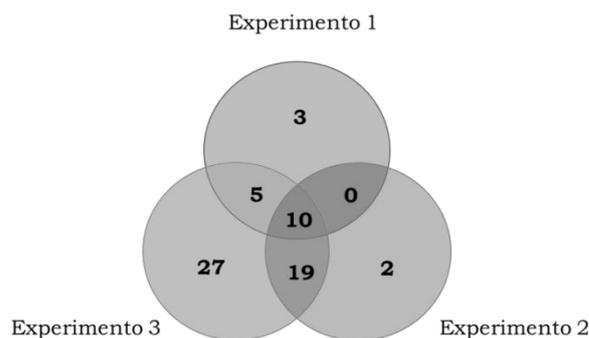
afinidad. Tras el análisis de los datos, se observó un gran número de proteínas unidas a la sefarosa-2'-AHC-c-di-GMP que también se encontraban presentes en los controles, unidas inespecíficamente a las esferas de sefarosa, muchas de las cuales eran proteínas ribosomales o chaperonas, muy abundantes en la célula. Sin embargo, en la sefarosa con el análogo c-di-GMP encontramos un número mayor de proteínas que no aparecían en los controles, indicando un enriquecimiento en posibles proteínas que unen c-di-GMP.

**Tabla 3.1. Proteínas identificadas en cada uno de los tres experimentos de afinidad realizados.**

	Número de proteínas		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
Total en la sefarosa AHC-c-di-GMP	74	76	121
Ausentes en la sefarosa control	39	51	52
Total en la sefarosa control	44	34	84
Ausentes en la sefarosa AHC-c-di-GMP	9	9	15
En ambas	35	25	69

Se representa el número total de proteínas identificadas en cada experimento de afinidad con el análogo 2'-AHC-c-di-GMP y con la sefarosa control, además del número de proteínas únicas para cada condición y las que aparecieron en ambas condiciones.

Debido a las uniones inespecíficas a sefarosa, se restringió el número de proteínas a analizar para descartar cualquier proteína que apareciera en algún experimento de la sefarosa control sin el análogo. De esta forma, tomando de forma conjunta los datos de los tres experimentos, pudimos identificar 66 proteínas distintas como posibles efectores con capacidad de unión a c-di-GMP que no aparecían en la sefarosa control sin el análogo de diguanilato. De estas 66 proteínas, solo 10 fueron comunes en los tres experimentos de afinidad (Fig. 3.3). Los experimentos 2 y 3 fueron los que presentaron un mayor número de proteínas comunes, siendo precisamente estos dos experimentos los que dieron un resultado positivo en los ensayos de *dot blot*.



**Figura 3.3. Proteínas eluidas por cromatografía de afinidad empleando el análogo 2'-AHC-c-di-GMP.** En el diagrama de Venn se representan solo las 66 proteínas que aparecieron en los tres experimentos de afinidad con el análogo del c-di-GMP, pero que no se encontraron en ninguno de los eluidos de la sefarosa control.

En la tabla 3.2 están incluidas las 66 proteínas que aparecieron en los experimentos de afinidad con el análogo del c-di-GMP y que no estaban presentes en ninguno de los controles. Con fondo verde se representan las 10 proteínas comunes en los tres experimentos de afinidad, en naranja las 19 proteínas eluidas en los experimentos 2 y 3, mientras que en morado se representan las proteínas que fueron identificadas en los experimentos 1 y 3. En azul, rojo y amarillo se encuentran las proteínas que fueron únicas en los experimentos 1, 2 y 3, respectivamente.

**Tabla 3.2. Proteínas identificadas en los tres experimentos de afinidad con sefarosa-2'-AHC-c-di-GMP.**

Nº acceso	Descripción	Gen	Área media <sup>†</sup>
Q2KBP0	AroC, corimato sintasa	RHE_CH00935	2,90 x 10 <sup>8</sup>
Q2KB42	BetB, betaína aldehído dehidrogenasa	RHE_CH01137	1,35 x 10 <sup>7</sup>
B3PZG1	DapD, 2,3,4,5-tetra-hidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succinil transferasa	RHE_CH00418	1,22 x 10 <sup>7</sup>
Q2K976	Dgt, desoxiguanosina-trifosfato trifosfohidrolasa, dGTPase	RHE_CH01817	1,32 x 10 <sup>7</sup>
Q2KDD4	Dut, desoxiuridina 5'-trifosfato nucleótido hidrolasa, dUTP pirofosfatasa	RHE_CH00330	9,69 x 10 <sup>6</sup>
Q2K8G2	GlmU, proteína bifuncional N-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa/glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa	RHE_CH02090	3,40 x 10 <sup>7</sup>
Q2KD99	GrpE, proteína de choque térmico	RHE_CH00365	2,69 x 10 <sup>7</sup>
B3PVB6	NrdR, represor transcripcional	RHE_CH01509	1,55 x 10 <sup>8</sup>
Q2K966	SurE, proteína de supervivencia de fase estacionaria, 5'-nucleotidasa	RHE_CH01827	2,63 x 10 <sup>8</sup>
Q2K4L8	TolB, proteína de translocación	RHE_CH03462	8,18 x 10 <sup>6</sup>
Q9AKR8	ArgC, N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	RHE_CH01567	5,03 x 10 <sup>6</sup>
B3PVY5	ClpX, subunidad de la proteasa Clp dependiente de ATP	RHE_CH01588	9,03 x 10 <sup>6</sup>

Q2KD47	DapE, succinil-diaminopimelato desuccinilasa	RHE_CH00417	6,23 x 10 <sup>6</sup>
Q2KCC6	FolD, proteína bifuncional, 5,10-metileno-tetrahydrofolato dehidrogenasa/5,10-metileno-tetrahydrofolato ciclohidrolasa	RHE_CH00694	7,45 x 10 <sup>6</sup>
Q2KDK0	PheS, Fenilalanina-tRNA ligasa subunidad alfa	RHE_CH00263	3,95 x 10 <sup>6</sup>
Q2K859	ThrS, Treonina-tRNA ligasa	RHE_CH02196	1,14 x 10 <sup>7</sup>
B3PW72	AllA, Ureidoglicolato hidrolasa	RHE_CH03139	2,92 x 10 <sup>6</sup>
Q2KBU1	AroA, 3-fosfosikimato 1-carboxiviniltransferasa	RHE_CH00884	6,2 x 10 <sup>6</sup>
Q2KDW7	DnaJ, chaperona	RHE_CH00144	3,98x 10 <sup>6</sup>
Q2KE54	HslU, subunidad de la proteasa HslUV dependiente de ATP	RHE_CH00049	1,03 x 10 <sup>7</sup>
Q2KDX9	KdsB, 3-desoxi-mano-octulosonato citidililtransferasa	RHE_CH00132	1,44 x 10 <sup>7</sup>
Q2K2V0	LeuB, 3-isopropil-malato dehidrogenasa	RHE_CH04093	2,50 x 10 <sup>7</sup>
B3PS18	LeuD, 3-isopropil-malato deshidratasa subunidad pequeña	RHE_CH04091	1,03 x 10 <sup>7</sup>
B3PZB6	MiaB, (di-metilalil)-adenosina tRNA metil-tiottransferasa	RHE_CH00376	4,69 x 10 <sup>6</sup>
Q2K2S1	MnmG, tRNA uridina 5-carboximetil-aminometil	RHE_CH04122	3,44 x 10 <sup>6</sup>
Q2K2X6	Obg, GTPasa	RHE_CH04067	4,89 x 10 <sup>6</sup>
Q2K7X0	PurL, fosforibosil-formilglicinamidina sintasa 2	RHE_CH02286	2,61 x 10 <sup>6</sup>
Q2K7T3	RecA, recombinasa A	RHE_CH02323	1,11 x 10 <sup>7</sup>
B3PXB3	UreC, subunidad alfa de la ureasa	RHE_CH03305	4,72 x 10 <sup>6</sup>
Q2KCY8	Pgi, Glucosa 6-fosfato isomerasa	RHE_CH00477	1,31 x 10 <sup>7</sup>
B3PWI6	HslV, subunidad de la proteasa HslUV dependiente de ATP	RHE_CH00048	6,95 x 10 <sup>6</sup>
Q2KE51	GlcB, malato sintasa G	RHE_CH00052	1,46 x 10 <sup>7</sup>
Q2K975	ArgS, arginina-tRNA ligasa	RHE_CH01818	9,49 x 10 <sup>6</sup>
Q2KE82	TrpB, subunidad beta de la triptófano sintasa	RHE_CH00021	8,33 x 10 <sup>6</sup>
Q2KD50	Fmt, Metionil-tRNA formiltransferasa	RHE_CH00414	2,44 x 10 <sup>6</sup>
B3PWI5	HisB, Imidazol-glicerol-fosfato deshidratasa	RHE_CH00047	2,00 x 10 <sup>6</sup>
Q2K9D7	Gpt, Xantina-guanina fosforibosiltransferasa	RHE_CH01754	4,73 x 10 <sup>6</sup>
B3PVT7	SecB, proteína de transporte	RHE_CH00006	4,54 x 10 <sup>7</sup>
Q2K386	DapF, Diaminopimelato epimerasa	RHE_CH03955	2,77 x 10 <sup>6</sup>
Q2K8Y5	PyrH, Uridilato quinasa	RHE_CH01915	1,28 x 10 <sup>7</sup>
Q2K3R7	SecA, translocasa	RHE_CH03770	1,28 x 10 <sup>7</sup>
B3PR22	LeuC, 3-isopropil-malato deshidratasa subunidad grande	RHE_CH03965	3,75 x 10 <sup>6</sup>
Q2K6B9	MurD, UDP-N-acetil-muramoil-alanina-D-glutamato ligasa	RHE_CH02849	5,47 x 10 <sup>6</sup>
B3PS36	PurH, proteína bifuncional en la biosíntesis de purina	RHE_CH04107	4,78 x 10 <sup>6</sup>
Q2K3S8	UbiG, 3-demetil-ubiquinona-9-3-metiltransferasa	RHE_CH03759	2,14 x 10 <sup>6</sup>
B3Q031	ArgB, acetil-glutamato kinasa	RHE_CH00428	4,07 x 10 <sup>6</sup>
B3PXX2	GatC, Aspartil/glutamil-tRNA amido-transferasa subunidad C	RHE_CH01854	5,59 x 10 <sup>5</sup>
B3Q001	GlgA, Glucógeno sintasa	RHE_CH03596	4,74 x 10 <sup>6</sup>
Q2K487	GlgB, enzima ramificadora del glucógeno	RHE_CH03594	4,11 x 10 <sup>6</sup>
B3PR71	IspG, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa	RHE_CH04009	9,88 x 10 <sup>5</sup>
B3PYC6	LepA, proteína de unión a GTP	RHE_CH00248	6,10 x 10 <sup>6</sup>
Q2K9R2	LolD, transportador ABC de lipoproteínas	RHE_CH01625	1,05 x 10 <sup>6</sup>
Q2K6C3	MurB, UDP-N-acetil-enol-piruvilglucosamina reductasa	RHE_CH02845	5,36 x 10 <sup>6</sup>
B3PSA1	PdxH, piridoxina/piridoxamine 5'-fosfato oxidasa	RHE_CH00941	6,94 x 10 <sup>6</sup>

### Capítulo III

B3PXI8	PhnN, ribosa 1,5-bisfosfato fosfoquinasa, guanilato quinasa	RHE_CH00154	3,22 x 10 <sup>6</sup>
Q2KCV5	PstB, proteína de importe de fosfato	RHE_CH00512	2,35 x 10 <sup>6</sup>
P77935	PurF, amidofosforibosil transferasa	RHE_CH01428	1,66 x 10 <sup>6</sup>
Q2K3X0	QueC, 7-ciano-7-deazaguanina sintasa	RHE_CH03711	7,70 x 10 <sup>5</sup>
Q2K5P8	QueF, 7-ciano-7-deazaguanina reductasa dependiente de NADPH	RHE_CH03071	1,22 x 10 <sup>7</sup>
Q2K2S7	LeuS, leucina-tRNA ligasa	RHE_CH04116	7,31 x 10 <sup>6</sup>
Q2KAZ5	Tam, trans-aconitato 2-metiltransferasa	RHE_CH01186	2,33 x 10 <sup>6</sup>
Q2K970	TatA, translocasa independiente del sistema Sec	RHE_CH01823	5,68 x 10 <sup>5</sup>
B3PVV3	TrpA, triptófano sintasa subunidad alfa	RHE_CH00022	5,64 x 10 <sup>6</sup>
Q2K880	TrpD, antranilato fosforibosiltransferasa	RHE_CH02174	4,08 x 10 <sup>6</sup>
B3PZ92	UbiE, Ubiquinona/menaquinona biosíntesis metiltransferasa	RHE_CH00354	5,04 x 10 <sup>6</sup>
Q2KBK9	Proteína hipotética, putativo regulador transcripcional	RHE_CH00966	4,41 x 10 <sup>6</sup>

En verde se representan las proteínas comunes en los tres experimentos de afinidad

En naranja se representan las proteínas de los experimentos 2 y 3

En morado se representan las proteínas de los experimentos 1 y 3

En azul se representan las proteínas únicas para el experimento 1

En rojo se representan las proteínas únicas para el experimento 2

En amarillo se representan las proteínas únicas para el experimento 3

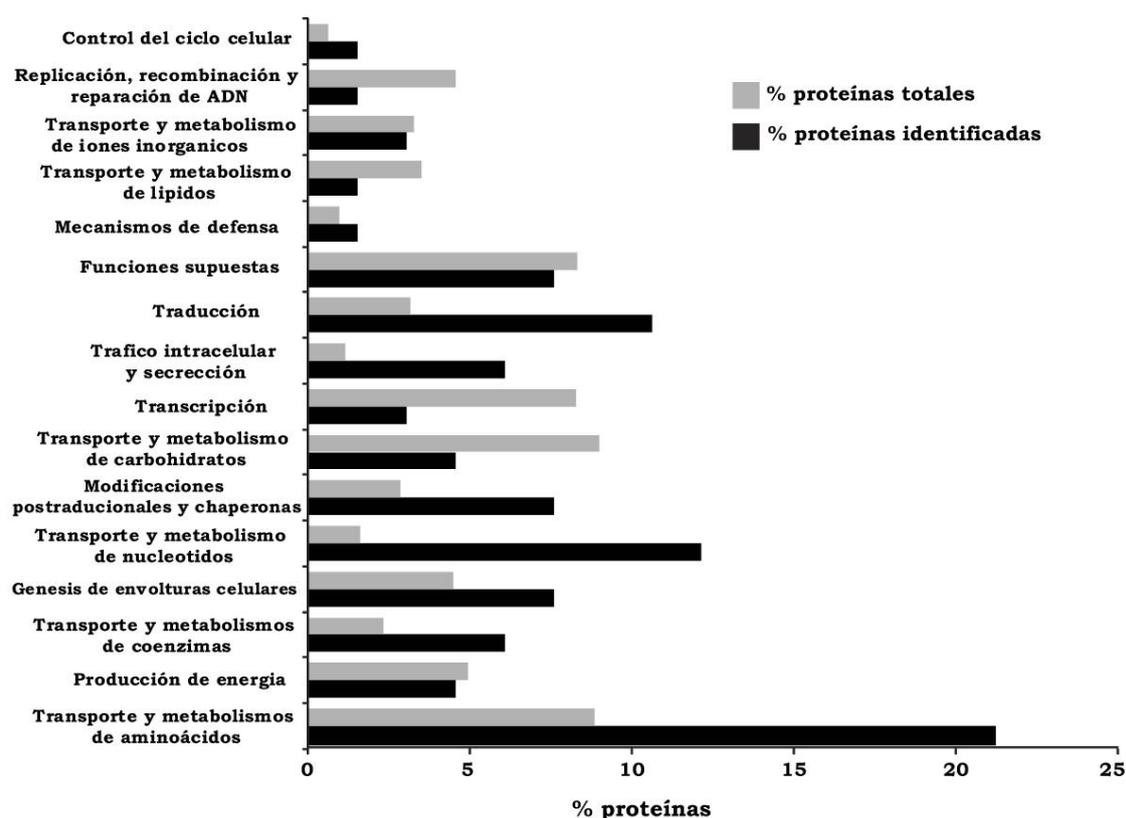
† Área media de cada pico perteneciente a un péptido identificado mediante LC-MS/MS.

La mayoría de estas 66 proteínas desempeñan o participan en funciones de mantenimiento o “*housekeeping*”, presentes en la mayoría de las bacterias, no habiendo ninguna proteína específica del grupo de los rizobios. Además, entre las proteínas listadas en la tabla 3.2, no se identificó ninguna previamente descrita que interactuara con el c-di-GMP, tales como proteínas con dominios PilZ o enzimas metabolizantes del c-di-GMP, DGCs o PDEs. También llamaba la atención que no apareciera ninguna proteína cuya función estuviera relacionada con algún proceso celular regulado por c-di-GMP, como motilidad o producción de exopolisacáridos, salvo las proteínas GlgA y GlgB, que aparecen solo en el experimento 3 y que están implicadas en la síntesis de glucógeno, polisacárido que de todas formas no está descrito como regulado por c-di-GMP.

Cabe destacar, que la mayoría de las proteínas identificadas posee algún dominio de unión a nucleótidos, sobre todo a GTP o ATP, por lo que la mayoría de las proteínas eluidas pudieran reconocer c-di-GMP de manera no específica.

Entre las proteínas eluidas encontramos casos de proteínas que participan en el mismo proceso celular, como SecA-SecB, HslU-HslV, TrpA-TrpB y GlgA-GlgB. También encontramos varias proteínas que intervienen en la misma ruta metabólica como, DapD-DapE-DapF, LeuB-LeuC-LeuD-LeuS, MurB-MurD, QueC-QueF, o PurF-

PurH-PurL, por lo que podríamos pensar que posiblemente se han co-purificado complejos proteicos en los que quizá solo una de las proteínas tiene capacidad de unir c-di-GMP. Además, encontramos casos de proteínas que aparentemente no tienen ninguna relación funcional pero los genes que las codifican están muy próximos en el genoma. Estos fueron los casos de Dgt (RHE\_CH01817), ArgS (RHE\_CH01818), TatA (RHE\_CH01823) y SurE (RHE\_CH01827); y también las proteínas HisB (RHE\_CH00047), HslV/U (RHE\_CH00048/RHE\_CH00049) y GlcB (RHE\_CH00052).



**Figura 3.4. Clasificación según categorías funcionales.** En negro se representa el porcentaje de proteínas identificadas en cada categoría funcional con respecto a las 66 proteínas. En gris se representa el porcentaje de proteínas en cada categoría funcional en relación al proteoma completo de *R. etli*.

Las 66 proteínas fueron clasificadas de acuerdo a su función asignada por la Rhizobase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/Etli>). Para ver que categorías funcionales se encontraban sobre o infrarrepresentadas en los experimentos de afinidad, se representó el porcentaje de proteínas identificadas de cada categoría funcional con respecto al total de proteínas identificadas, y se comparó con el porcentaje de proteínas totales de cada categoría funcional con respecto al proteoma de Ret (Fig. 3.4). Las categorías más sobrerrepresentadas fueron las de transporte y metabolismo de

aminoácidos y nucleótidos así como la de tráfico intracelular y secreción. Por otro lado, las categorías relacionadas con la replicación y reparación del ADN, la transcripción y el transporte de lípidos y carbohidratos se encontraban infrarrepresentadas (Fig. 3.4).

#### **3.2.1. Estudio detallado de proteínas candidatas a efectores del c-di-GMP**

Para continuar con el análisis de las proteínas identificadas mediante cromatografía de afinidad, decidimos examinar de forma exhaustiva las 66 proteínas recogidas en la tabla 3.2. Con ayuda de las bases de datos InterPro y Pfam esta lista se redujo a 9 proteínas candidatas, considerando la reiteración en las diferentes réplicas experimentales, la presencia de posibles dominios proteicos involucrados en el reconocimiento y unión de nucleótidos, así como de otras características que de alguna manera pudieran estar relacionadas con la señalización por c-di-GMP, por ejemplo, la biosíntesis de precursores de EPS. Además, como controles positivos decidimos incluir en este estudio tres proteínas del proteoma de *Ret* con dominios PilZ predichos, RHE\_CH02207, RHE\_CH01767 y la proteína CeaA, además de la porción C-terminal conteniendo el dominio PilZ de esta última.

**1. Dgt, desoxiguanosina-trifosfato trifosfohidrolasa (RHE\_CH01817).** Esta proteína apareció en los tres experimentos de afinidad con el análogo 2'-AHC-c-di-GMP. Pertenece a la familia de las dNTP trifosfohidrolasas capaces de hidrolizar los dNTP a su correspondiente desoxinucleósido y trifosfato. En *E.coli* se ha comprobado que Dgt tiene preferencia por el dGTP, presentando actividad dGTPasa. Mutantes en esta proteína acumulan dos veces más dGTP, mientras que su sobreexpresión produce una reducción de cinco veces en los niveles de dGTP con respecto a la cepa silvestre (Beauchamp & Richardson, 1988; Gawel *et al.*, 2008). Recientemente, también en esta bacteria se ha descrito que Dgt actúa formando hexámeros y que presenta un sitio de unión a ADN de cadena sencilla, cuya unión modula la actividad dGTPasa (Singh *et al.*, 2015). En otras bacterias como *Thermus thermophilus*, Dgt presenta una actividad más amplia pudiendo degradar diferentes dNTP (Mega *et al.*, 2009). En *Ret*, la proteína Dgt contiene dominios HD típicos de la superfamilia de fosfohidrolasas. Presenta un tamaño de 405 aminoácidos y se desconoce su actividad y función biológica.

**2. SurE, proteína de supervivencia de fase estacionaria (RHE\_CH01827).** Apareció en los tres experimentos de afinidad con el análogo del c-di-GMP. SurE se

encuentra muy conservada en Arqueas, Eubacterias y Eucariotas. Su estructura ha sido caracterizada en diversas bacterias como los termófilos *Thermotoga maritima* y *T. thermophilus* o en el patógeno *S. typhimurium* (Pappachan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2001), bacterias en las que presenta actividad nucleotidasa, actuando sobre nucleósidos 5' y 3'-monofosfato. En *E. coli*, mutantes en esta proteína muestran una reducida supervivencia frente a estreses salinos y altas temperaturas durante la fase estacionaria, indicando una participación de SurE en la supervivencia a estreses (Li *et al.*, 1994). La proteína RHE\_CH01827 de Ret presenta un 38% de identidad de secuencia con SurE de *E. coli*.

**3. GlmU, proteína bifuncional con actividad N-acetil-glucosamina-1-fosfato uridiltransferasa y glucosamina-1-fosfato acetiltransferasa (RHE\_CH02090).** Esta proteína, que fue común en los tres experimentos de afinidad con el análogo del c-di-GMP, se encuentra caracterizada en diferentes bacterias como *E. coli*, *Yersinia pestis* o *Mycobacterium tuberculosis* (Olsen & Roderick, 2001; Patin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009). GlmU cataliza los dos últimos pasos de la síntesis de UDP-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc), un importante intermediario para la síntesis del peptidoglucano o el lipopolisacárido. El dominio C-terminal se encarga de transferir el grupo acetilo desde acetil-CoA hasta la glucosamina-1-fosfato, mientras que el dominio N-terminal transfiere el UTP a la N-acetil-glucosamina-1-fosfato, para dar lugar a UDP-GlcNAc (Gehring *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 2007). GlmU forma trímeros para llevar a cabo sus dos actividades enzimáticas, aunque también se ha observado la formación de hexámeros que podrían tener importancia para el control de la actividad enzimática (Trempe *et al.*, 2011).

Como se ha descrito en la introducción de esta tesis doctoral, en *E. coli* y otras bacterias la producción del exopolisacárido poli- $\beta$ -1-6-N-acetil-glucosamina (PNAG), se encuentra regulada por c-di-GMP (Steiner *et al.*, 2012), aunque en Ret no se ha descrito la síntesis de PNAG.

**4. NrdR, represor transcripcional (RHE\_CH01509).** Este hipotético regulador transcripcional también apareció en los tres experimentos de afinidad empleando el análogo del c-di-GMP. En *Streptomyces coelicolor*, NrdR inhibe la expresión de los genes de ribonucleotidasas mediante la unión a una región específica localizada en el promotor de estos genes (Borovok *et al.*, 2004). Contiene un dominio ATP-cone

(Grinberg *et al.*, 2006) capaz de percibir los niveles de dNTP en el interior celular y que modula su capacidad de unión al ADN (Grinberg *et al.*, 2006; Rodionov & Gelfand, 2005). La hipotética proteína NrdR de Ret tiene 158 aminoácidos y muestra una identidad del 41% con la proteína NdrR de *S. coelicolor*. A diferencia de esta bacteria, en *R. etli* el gen para esta proteína tipo NrdR está asociado a genes teóricamente implicados en la biosíntesis de riboflavina, al igual que en muchas otras bacterias Gram-negativas.

**5. Alla, Ureidoglicolato liasa (RHE\_CH03139).** Esta pequeña proteína de 166 aminoácidos apareció en los experimentos 2 y 3. Algunas bacterias son capaces de utilizar la alantoína como fuente de nitrógeno. En el caso de *E. coli*, Alla es la encargada de la degradación del intermediario resultante del catabolismo de la alantoína, el S-ureidoglicolato, hasta urea y glioxilato (Raymond *et al.*, 2005). Además Alla, contiene un dominio conocido como “RmlC-like jelly roll fold” (IPR014710) que podría estar implicado en la unión a nucleótidos, similar al dominio de unión a cAMP descrito en las proteínas CRP (cAMP receptor protein).

**6. Pgi, glucosa 6-fosfato isomerasa (RHE\_CH00477).** Esta proteína presente en la mayoría de los seres vivos (eucariotas, procariotas y arqueas), cataliza la isomerización reversible de la glucosa 6-fosfato a fructosa 6-fosfato. Su actividad es clave en el metabolismo de carbohidratos de la célula, interviniendo en los procesos de glicólisis, gluconeogénesis y en la ruta de las pentosas fosfato (Hansen & Schonheit, 2005). Mutaciones en este gen provocan alteraciones en la capacidad de utilización de determinadas fuentes de carbono. En *E. coli*, por ejemplo, un mutante en el gen *pgi* presenta una reducción del crecimiento con glucosa como una única fuente de carbono, pues queda impedida la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas por lo que la glucosa ha de ser metabolizada por la ruta de la pentosas fosfato (Canonaco *et al.*, 2001).

La proteína Pgi de Ret fue identificada en los experimentos 1 y 3 de cromatografía con el análogo de c-di-GMP. Presenta una identidad del 55% con la Pgi de humanos y como Alla, posee un dominio “RmlC-like jelly roll fold”.

**7. ClpX, subunidad X de la proteasa Clp dependiente de ATP (RHE\_CH01588).** Homólogos de ClpX, junto con la subunidad ClpP, son capaces de degradar sustratos proteicos específicos en diferentes bacterias. Presenta un dominio Walker A (AAA+), similar al del regulador transcripcional FleQ de *P. aeruginosa*, que

---

interacciona con el c-di-GMP activando la expresión de los genes del polisacárido *pel* (Baraquet & Harwood, 2013).

En *C. crescentus*, la proteasa ClpXP degrada la fosfodiesterasa PdeA y el inhibidor de la replicación CtrA, cuya localización depende de PopA, una proteína efectora que une c-di-GMP, permitiendo el progreso del ciclo celular (Duerig *et al.*, 2009). Recientemente, se ha descrito en diferentes especies del género *Pseudomonas* que las ATPasas FliI, HrcnN y ClpB2 son capaces de unir c-di-GMP con alta afinidad (Trampari *et al.*, 2015).

Es interesante resaltar el entorno génico del gen *clpX* en *R. etli* CFN42, ya que en sus proximidades encontramos dos genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF (RHE\_CH01586 y RHE\_CH01584), separados por una citocromo hidroxilasa. Estas dos DGC se encuentran muy conservadas en distintas especies del género *Rhizobium*.

**8. TolB, proteína de translocación (RHE\_CH03462).** Identificada en los tres experimentos de afinidad con el análogo del c-di-GMP. Una proteína homóloga apareció en los experimentos de afinidad realizados por Düvel y colaboradores en *P. aeruginosa* (Düvel *et al.*, 2012). TolB está muy conservada en diferentes bacterias Gram negativas y estaría implicada en la captación de diferentes compuestos del exterior y en el mantenimiento de la membrana externa (Clavel *et al.*, 1998; Lazzaroni *et al.*, 1999). Tiene dos dominios claramente diferenciados: el N-terminal compuesto por alfa hélices, que estructuralmente se asemeja al dominio C-terminal de las ARN ligasas; y un dominio C-terminal formado por laminas  $\beta$ , cuya estructura recuerda a numerosos miembros de la familia de propil oligopeptidasas (Abergel *et al.*, 1999). TolB se localiza en el periplasma con un dominio transmembrana que la ancla a la membrana externa y a través de su interacción con TolA mantienen la membrana externa e interna relativamente próximas (Walburger *et al.*, 2002).

**9. AroA, 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (RHE\_CH00884).** Esta proteína interviene en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos a partir de corismato (ruta del shikimato), tanto en bacterias como en hongos y plantas (Berti & Chindemi, 2009). AroA cataliza la reacción de formación de 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato. Además, contiene un dominio similar al presente en las ARN 3'-fosfato ciclasas, que se encarga de convertir el extremo 3' del ARN en un enlace 2'3'-fosfodiéster empleando

ATP (Palm *et al.*, 2000). AroA apareció en los experimentos 2 y 3 de cromatografía de afinidad con el análogo del c-di-GMP.

**10. CelA, celulosa sintasa A (RHE\_CH01542).** Esta y las siguientes proteínas fueron elegidas como proteínas que contienen hipotéticos dominios PilZ, y por tanto, probablemente son capaces de unir c-di-GMP. CelA junto con CelB forman las dos subunidades catalíticas de la celulosa sintasa en numerosas bacterias. CelA contiene un dominio PilZ que activa la producción de celulosa mediante su unión al c-di-GMP. En Ret CelA es una proteína con 748 aminoácidos (88 KDa) que posee 8 hipotéticos dominios transmembrana. Además de la sobreexpresión de la proteína CelA completa, para evitar problemas de solubilidad, decidimos llevar a cabo la sobreexpresión de la parte C-terminal de la proteína que contiene el dominio PilZ de CelA (Fujiwara *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2014). A este fragmento proteico lo denominamos celPilZ.

**11. Proteína hipotética RHE\_CH01767.** Es una de las 3 proteínas de *R. etli* CFN42 que tienen un dominio PilZ. Presenta 35% identidad con la proteína McrA de *Sme* 2011 (SMc00507) implicada en la inhibición de la motilidad con altos niveles de c-di-GMP (Schäper *et al.*, 2016), aunque su función biológica en Ret se desconoce. Podría formar operón con una 2'3'fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y con otra proteína hipotética de la familia de reguladores transcripcionales tipo AsnC.

**12. Proteína hipotética RHE\_CH02207.** Proteína de 161 aminoácidos con un dominio PilZ que ocupa la mitad C-terminal de la proteína. Estudios *in silico* han sugerido que la transcripción de este gen en *S. meliloti* puede depender del factor sigma alternativo RpoN, sugiriendo un posible papel en la interacción simbiótica (Dombrecht *et al.*, 2002). En muchas bacterias, particularmente rhizobiales, aparece siempre asociada a otra proteína de función desconocida (RHE\_CH02206), que posee un teórico dominio sensor PAS (IPR009922).

Una vez seleccionadas las proteínas más interesantes, la estrategia seguida para cada una fue: (i) clonar el gen en un vector para su sobreexpresión en *E. coli*; (ii) comprobar la expresión proteica en geles SDS-PAGE; (iii) determinar la posible unión al c-di-GMP mediante ensayos *dot-blot* empleando el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP.

Los genes de 11 de las 12 proteínas seleccionadas fueron clonados bajo control del promotor T5 en el vector de expresión pQE-80L. Posteriormente todas las

construcciones fueron introducidas en la cepa de *E. coli* OmniMax (OM) la cual posee un gen *lacI<sup>q</sup>*, útil para minimizar la expresión de proteínas que puedan resultar potencialmente tóxicas, en ausencia del inductor IPTG. En aquellos casos en que los niveles de expresión de la proteína no fueron los adecuados, la construcción se introdujo en otras cepas de *E. coli* disponibles en el laboratorio, como fueron *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3) y C43 (DE3). Estas dos últimas cepas son mutantes derivados de BL21 (DE3), que han sido seleccionadas por su mejor rendimiento a la hora de sobreexpresar proteínas tóxicas o de membrana (Miroux & Walker, 1996).

En el caso de la proteína CelA, la falta de enzimas compatibles en el vector pQE-80L, nos obligó a usar el vector pET-28b (+), donde el gen clonado queda bajo el control del promotor del fago T7. A continuación, la construcción pET28celA se introdujo en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3), C41 (DE3) y/o C43 (DE3), las cuales portan una copia cromosómica de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Para más información sobre la construcción de los distintos clones, consultar el anexo 3.

### **3.3. Sobreexpresión en *E. coli* de posibles proteínas efectoras de *R. etli* CFN42**

Una vez obtenidos los clones con los genes que codifican las diferentes proteínas, se procedió a determinar la expresión de las mismas mediante electroforesis en geles de proteínas SDS-PAGE. Como punto de partida, se tomaron unas condiciones estándar para la expresión de todas las proteínas, que se describen detalladamente en el apartado 2.20.1 de la sección Materiales y Métodos. Brevemente, a partir de un precultivo se inocularon matraces de 10 ml (1/50) y se dejaron crecer a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.7, para posteriormente inducir con 1 mM de IPTG y dejar crecer a 30°C, tomando muestras para el análisis mediante geles SDS-PAGE a las 3 y 24 horas tras la inducción.

La mayoría de las proteínas (Tabla 3.3) presentaron un nivel aceptable de expresión a las 3 horas de la inducción con el IPTG. Sin embargo, las proteínas AllA, CelA y celPilZ no pudieron ser identificadas visualmente en geles SDS-PAGE, ni siquiera tras la variación de diferentes condiciones para intentar mejorar la expresión, como las cepas de *E. coli* empleadas, la temperatura o la cantidad de IPTG. Una vez comprobada la expresión proteica en estas condiciones estándar, se procedió a

### Capítulo III

determinar la solubilidad de las distintas proteínas. Para ello, siguiendo el protocolo de crecimiento descrito, tras la recogida se procedió a la rotura de las células con ayuda de un sonicador. Tras centrifugar las muestras, para separar la porción soluble de los restos celulares y posibles cuerpos de inclusión, ambas partes fueron analizadas en geles SDS-PAGE.

En la tabla 3.3, se recogen los datos más relevantes de cada proteína, indicando la cepa donde se obtuvieron los mejores niveles de expresión, la expresión de las mismas basándonos en la cantidad de proteína observada en los geles SDS-PAGE, el grado de solubilidad y el tamaño estimado.

**Tabla 3.3. Propiedades de las proteínas sobreexpresadas**

<b>Proteína</b>	<b>Cepa de <i>E.coli</i> con mayor expresión</b>	<b>Expresión*</b>	<b>Solubilidad*</b>	<b>Tamaño estimado (KDa)</b>
<b>Dgt</b>	OmniMax	+	+	46.8
<b>SurE</b>	OmniMax	+	-	29.2
<b>GlmU</b>	OmniMax	++	++	48.5
<b>NrdR</b>	OmniMax	+	+	19.5
<b>AllA</b>	OmniMax, BL21, C41 y C43	-	-	19.8
<b>Pgi</b>	OmniMax	+	++	59.9
<b>ClpX</b>	OmniMax	++	-	48.2
<b>TolB</b>	OmniMax	+	-	49.1
<b>AroA</b>	OmniMax	+	+	46
<b>CelA</b>	OmniMax, BL21, C41 y C43	-	-	88.1
<b>CelPilZ</b>	OmniMax, BL21, C41 y C43	-	-	21
<b>1767</b>	C41	+	-	16.8
<b>2207</b>	OmniMax	++	++	24.6

\* Cantidad relativa de proteína observada en las diferentes fracciones:

(++) Banda de tamaño esperado visible en proporción elevada

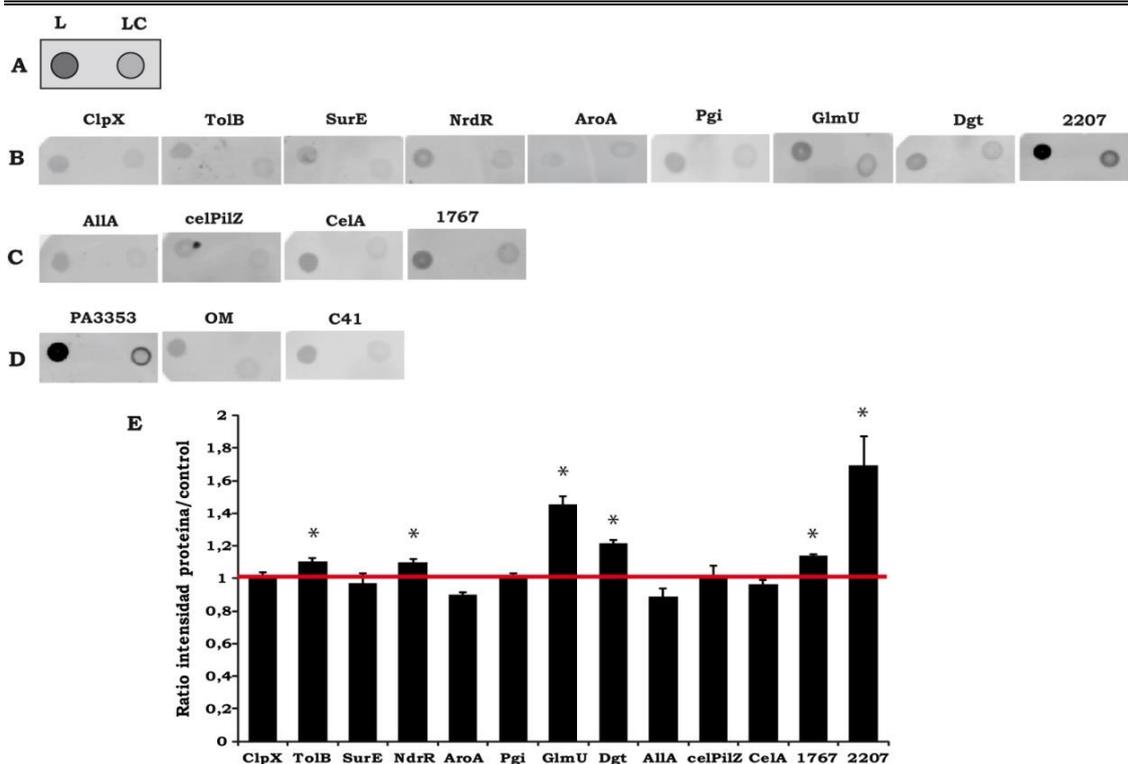
(+) Banda de tamaño esperado visible

(-) Banda de tamaño esperado no visible

Una vez comprobados los niveles de expresión y la solubilidad de cada proteína en geles SDS, se procedió a corroborar la posible unión de las proteínas con el c-di-GMP. Para ello, utilizamos la técnica de *dot blot* descrita anteriormente, empleando lisados de cultivos de *E. coli* que sobreexpresaban cada una de estas proteínas. El crecimiento de los cultivos se realizó siguiendo el protocolo para las condiciones estándar. A continuación, se procedió a la rotura de las células mediante ultrasonidos (sonicador). A esta fracción de lisados celulares se la denominó lisado (L). Parte de este lisado se centrifugó por 5 minutos a 4°C, para separar las células no rotas, restos celulares y cuerpos de inclusión y el sobrenadante obtenido se denominó lisado claro (LC). A ambas fracciones, L y LC, se les determinó la concentración proteica mediante Bradford, para posteriormente igualar ambas fracciones a la misma concentración de proteínas, 1 mg/ml. Una vez igualadas las fracciones, se colocaron sobre membranas de nitrocelulosa gotas de 3 µl (3 µg) de las fracciones L y LC para cada proteína. Tras dejar secar las gotas y bloquear las membranas, posteriormente se incubaron con 1 µM del análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. A continuación, se procedió al revelado de las membranas en un escáner de fluorescencia (FosfoImager Pharos, BioRad).

En la figura 3.5, se muestran ensayos de *dot blot* representativos para cada una de las proteínas sobreexpresadas. Igualmente en estos ensayos se incluyeron las respectivas cepas control, portadoras del vector vacío (pQE-80L o pET-28b (+) en el caso de CelA). Esto es importante, ya que cada cepa de *E. coli* puede producir un fondo o señal basal diferente, debido probablemente a las diferencias cualitativas y cuantitativas en proteínas que pueden unir c-di-GMP. Como control positivo se emplearon lisados de *E. coli* BL21 (DE3) sobreexpresando la proteína PA3353 de *P. aeruginosa*, la cual posee un dominio PilZ y una elevada afinidad por el c-di-GMP ( $262 \pm 66$  nM) (Düvel *et al.*, 2012).

Para la cuantificación de los *dot-blot* por densitometría, el valor promedio del lisado claro de cada proteína fue dividido por el valor obtenido por su correspondiente cepa control (Fig. 3.5E). De esta forma, todas las proteínas con un valor superior a 1 indican una señal fluorescente superior a su control.



**Figura 3.5. Ensayos de dot blot de posibles proteínas efectoras de *R. etli* CFN42.** 3  $\mu$ l de lisados (L) y lisados claros (LC) de células de *E. coli* sobreexpresando las proteínas indicadas, fueron depositados sobre membranas de nitrocelulosa e incubados con 1  $\mu$ M del análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. A) Representación esquemática de la distribución de las gotas. B) Proteínas expresadas desde *E. coli* OmniMax (OM). C) Proteínas expresadas desde *E. coli* C41 (DE3), D) Control positivo (PA3353) y controles de cada cepa. E) Densitometría de los lisados claros de los ensayos de dot blot arriba representados, donde la señal promedio de cada proteína fue dividida entre la señal de su respectiva cepa control. Cada barra representa las medidas de tres réplicas técnicas. Los asteriscos (\*) indican aquellas proteínas que presentaron un incremento de la fluorescencia estadísticamente significativo respecto a la cepa control.

De las tres proteínas con dominios PilZ de Ret ensayadas, solo las proteínas hipotéticas RHE\_CH02207 y RHE\_CH01767 dieron una señal positiva, más acusada en RHE\_CH02207. En el caso de la proteína CelA o de su dominio PilZ (celPilZ), no fue posible determinar por esta técnica su unión con el análogo del c-di-GMP. Esto podría ser debido a los problemas de expresión anteriormente comentados (tabla 3.3). Por otro lado, de las 9 proteínas seleccionadas de los experimentos de afinidad, TolB, NdrR, GlmU y Dgt dieron una señal ligeramente más intensa, tanto para el lisado (L) como para el lisado claro (LC), en comparación con la cepa control OM portando el plásmido pQE-80L vacío, aunque con unos niveles mucho menores a los observados con el control positivo PA3353 (Fig. 3.5). No obstante, además de una mayor expresión y estabilidad de PA3353, es posible que ciertos efectores de c-di-GMP de Ret puedan

presentar unas constantes de afinidad menores a las observadas en *Pseudomonas*, ya que incluso las proteínas portadoras de dominios PilZ, RHE\_CH02207 y RHE\_CH01767, presentaron una afinidad de unión mucho menor que la proteína PA3353. El resto de proteínas mostraron una señal fluorescente similar o incluso menor que las cepas control (OM o C41). Para abordar un estudio más profundo, nos decantamos por las proteínas GlmU y Dgt, únicas proteínas de Ret que presentaron unos valores de fluorescencia comprendidos entre los de las proteínas portadoras de dominios PilZ, RHE\_CH02207 y RHE\_CH01767 (Fig. 3.5E).

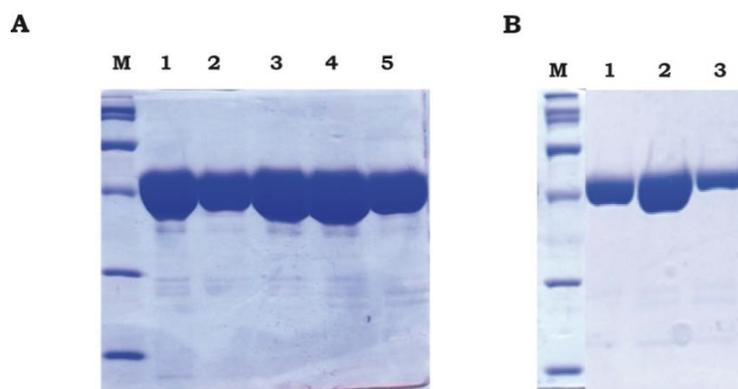
### **3.3.1. Ensayos de dot blot de las proteínas GlmU y Dgt purificadas**

Como ha quedado reflejado en los ensayos de *dot blot* de la figura 3.5, los extractos de cultivos productores de proteínas GlmU y Dgt mostraron la señal fluorescente más elevada. Este aumento apuntaba a una mayor unión de dichas proteínas al análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Para comprobar esto, decidimos purificar ambas proteínas (GlmU y Dgt), eliminando de esta forma el fondo de cada cepa y la posible interferencia con cualquier otra proteína presente en los lisados de Ret, y comprobar su unión mediante *dot blot* con el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP.

Para los ensayos de *dot-blot* a partir de lisados bacterianos (Fig. 3.5), GlmU y Dgt fueron sobreexpresadas en la cepa OmniMax portando los plásmidos pQE80-glmU y pQE80-dgt, respectivamente. Los niveles de expresión proteica y la solubilidad de ambas proteínas resultaron ser adecuadas, por lo que decidimos realizar el proceso de purificación utilizando la misma cepa y condiciones de expresión: crecimiento en LB a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.5-0.7, inducción con IPTG 1 mM y recoger las células tras 3 horas de crecimiento a 30°C.

Los vectores pQE-80L codifican una cola de 6 histidinas (6xHis) para su fusión con el extremo N-terminal de la proteína diana, facilitando su purificación mediante el empleo de columnas de níquel. Tras el proceso de purificación de GlmU y Dgt mediante FPLC, ambas proteínas fueron dializadas en tampón fosfato ( $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$  50 mM, NaCl 300 mM, pH = 8) para eliminar los restos de imidazol procedente de la elución de las proteínas. Para más información del proceso de purificación de las proteínas consultar el apartado 2.20.3 de la sección Materiales y Métodos.

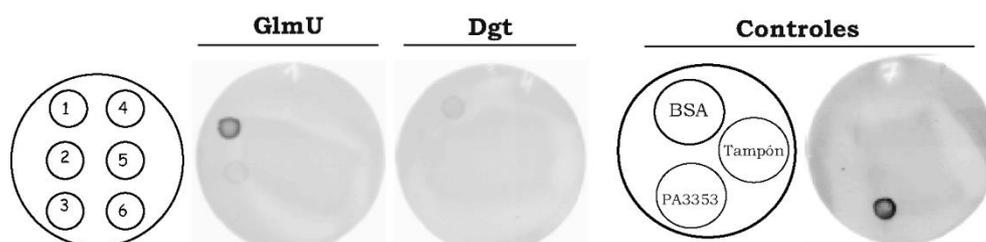
Como puede apreciarse en la figura 3.6, tras el proceso de purificación, la pureza de GlmU y Dgt, parecía lo suficientemente alta para realizar nuevos ensayos de *dot blot* con el análogo fluorescente del c-di-GMP. Las cantidades de cada proteína fueron determinadas mediante Bradford, obteniendo una concentración de 50  $\mu$ M para GlmU y 70  $\mu$ M para Dgt.



**Figura 3.6. Purificación de las proteínas GlmU (A) y Dgt (B).** Distintas fracciones de ambas proteínas tras el proceso de purificación fueron analizadas mediante geles SDS-PAGE para observar su pureza. M, marcador; carriles 1-5 (A) GlmU; carriles 1-3 (B) Dgt.

Para los ensayos de *dot blot* con las proteínas purificadas, realizamos diluciones seriadas 1/10 de cada proteína desde 100 pmol hasta 0.001 pmol, colocando un total de 6 gotas en cada membrana de nitrocelulosa (Fig. 3.7). En este caso, como control negativo usamos el tampón suplementado con 100 pmol de la proteína BSA (Sigma). Como control positivo de la técnica, empleamos de nuevo lisados bacterianos de *E. coli* sobreexpresando la proteína PA3353 de *P. aeruginosa*.

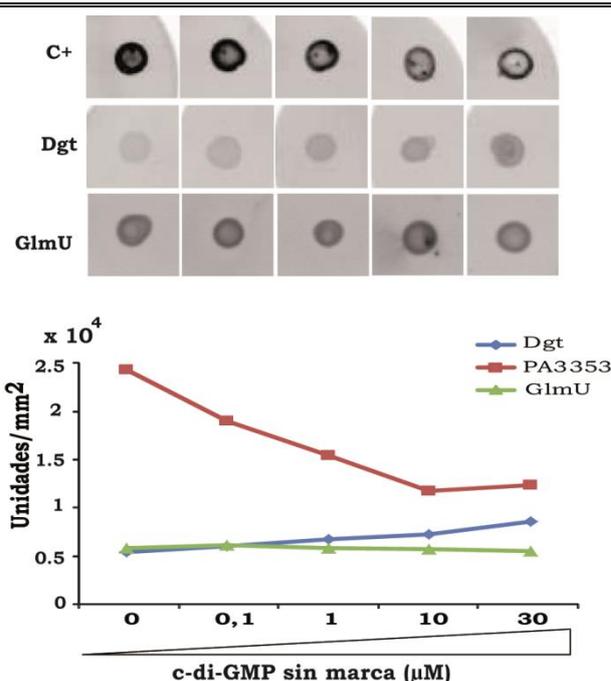
Los ensayos de *dot blot* con las proteínas GlmU y Dgt purificadas ratificaron su capacidad de unión con el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP, observándose un aumento de la señal fluorescente dependiente de la cantidad de proteína (Fig. 3.7). Al igual que lo observado en los lisados, la proteína purificada GlmU presentaba una afinidad mayor por este análogo del c-di-GMP que la proteína Dgt, dando una señal fluorescente más intensa. La ausencia total de señal por parte de la proteína BSA y del tampón de diálisis, indicaban que la fluorescencia observada era exclusivamente debida a una interacción entre el derivado fluorescente de c-di-GMP y las respectivas proteínas.



**Figura 3.7. Ensayos de dot blot con las proteínas GlmU y Dgt purificadas.** Diluciones seriadas 1/10 de cada proteína, desde 100 pmol (1) hasta 0.001 pmol (6), fueron incubadas sobre membranas de nitrocelulosa con 1  $\mu$ M del análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Como control positivo se usó lisado de *E.coli* sobreexpresando la proteína PA3353 de *P. aeruginosa*, mientras que como control negativo se usaron 100 pmol de BSA, además del control del tampón de diálisis.

Los ensayos de *dot blot* también son una buena herramienta para realizar ensayos de competición de una forma rápida, añadiendo concentraciones crecientes de c-di-GMP puro, sin marcaje. Para ello, se colocaron sobre membranas de nitrocelulosa gotas con una cantidad constante de proteína (7.3  $\mu$ g para GlmU y 9.8  $\mu$ g para Dgt), posteriormente las membranas se incubaron con una mezcla de 0.1  $\mu$ M de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP y concentraciones crecientes de c-di-GMP sin marcar (0.1, 1, 10 y 30  $\mu$ M).

En el caso del control positivo con la proteína PA3353 de *P. aeruginosa*, se observa una disminución de la señal fluorescente dependiente de la concentración de c-di-GMP no marcado, indicando una interacción específica de esta proteína con el c-di-GMP (Fig. 3.8). Sorprendentemente a lo esperado, la proteína Dgt mostró un ligero aumento de la fluorescencia al aumentar la concentración de c-di-GMP sin marca. Este hecho nos llevó a pensar un posible papel cooperativo del c-di-GMP. Sin embargo, la proteína GlmU, no mostró ninguna variación al aumentar la concentración de c-di-GMP (Fig. 3.8), sugiriendo una unión no específica, o bien que GlmU presenta mayor afinidad por el derivado fluorescente que por el c-di-GMP sin marcar.

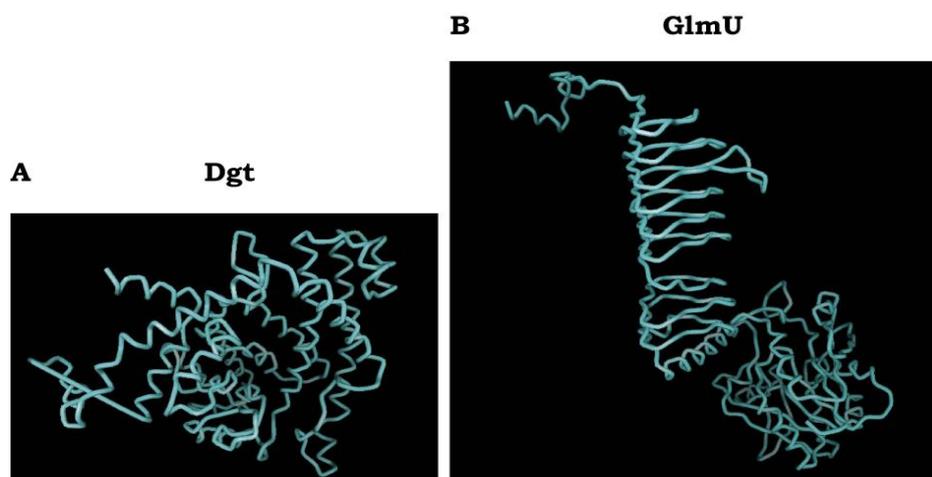


**Figura 3.8. Ensayo de dot blot competitivo.** Las proteínas Dgt y GlmU purificadas, junto con lisados de *E. coli* sobreexpresando la proteína PA3353 como control positivo (C+), se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa para posteriormente incubarlas con una mezcla de 0.1 μM de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP y cantidades crecientes de c-di-GMP no marcado (0, 1, 1, 10 y 30 μM).

### 3.3.2. Estudio detallado de las proteínas Dgt y GlmU

En Ret la proteína Dgt se encuentra anotada como una desoxiguanosina trifosfato trifosfohidrolasa (dGTPasa) con un tamaño de 405 aminoácidos (Fig. 3.9A). Esta proteína presenta un dominio HD típico de la superfamilia de fosfohidrolasas, que intervienen en la coordinación de diferentes metales (Aravind & Koonin, 1998). La secuencia de aminoácidos de la proteína Dgt de Ret muestra un porcentaje de identidad del 25% con respecto a la de *E. coli*. En esta bacteria Dgt muestra una fuerte preferencia por dGTP (Seto *et al.*, 1988), sin embargo, en *P. aeruginosa*, *T. termophilus* y *Enterococcus faecalis*, las respectivas Dgts tienen un espectro mayor y son capaces de hidrolizar cualquier dNTP (Kondo *et al.*, 2004; Mega *et al.*, 2009; Vorontsov *et al.*, 2011). La estructura de Dgt de *E. coli*, revela que esta proteína actúa como hexámero y que su actividad se encuentra regulada por la unión de dos moléculas de ADN de cadena sencilla por cada hexámero (Singh *et al.*, 2015). La principal función biológica asignada a esta proteína es la de mantener un balance adecuado de dGTP en la célula, ya que mutaciones en el gen *dgt* de *E. coli* incrementan de forma considerable la aparición

de mutaciones, debido a una mayor cantidad de dGTP en el interior celular (Gawel *et al.*, 2008).



**Figura 3.9. Modelo de estructura terciaria de las proteínas Dgt (A) y GlmU (B) de *R. etli* CFN42.** Para la predicción de la estructura de estas proteínas se ha utilizado el software Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). Se muestra la forma monomérica de cada proteína.

GlmU ha sido previamente caracterizada en *E. coli*, *Yersinia pestis* y *Haemophilus influenzae*, entre otros organismos (Mochalkin *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2007; Patin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009). Es una proteína funcional que cataliza los dos últimos pasos de la biosíntesis de UDP-N-acetil-glucosamina (UDP-NAG), un metabolito esencial para la formación de ciertos polímeros como el lipopolisacárido y el peptidoglucano en Gram-negativas. GlmU presenta dos dominios claramente diferenciados, llevando a cabo sus dos actividades enzimáticas de forma separada (Gehring *et al.*, 1996). En primer lugar, cataliza la acetilación de la glucosamina 1-fosfato a partir de acetyl-CoA, dando lugar a N-acetil-glucosamina-1-fosfato. La segunda reacción es la transferencia de un grupo uridil empleando UTP como sustrato, para dar lugar al producto final, UDP-NAG. La primera actividad se encuentra en el extremo C-terminal, que presenta numerosas repeticiones de hexapéptidos en láminas  $\beta$  dándole una inusual conformación (Fig. 3.9B), mientras que la segunda actividad está asociada a su dominio globular N-terminal (Olsen & Roderick, 2001). Estudios recientes han puesto de manifiesto que es necesaria la presencia de cationes  $Mg^{2+}$  para ambas actividades y que la presencia de agentes reductores incrementa la actividad acetiltransferasa en *Y. pestis* (Patin *et al.*, 2015). Además, GlmU actuaría como un homotrímero (Pompeo *et al.*, 2001).

Debido a la esencialidad de GlmU y de la importancia del exopolisacárido poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) en bacterias como *E. coli* o *Staphylococcus epidermis*, GlmU se ha convertido en una potente diana para el diseño de nuevos antibióticos (Burton *et al.*, 2006).

En Ret la hipotética proteína GlmU, con 453 aminoácidos, presenta un porcentaje de identidad del 41% respecto a GlmU de *E. coli*.

### **3.4. Caracterización de las proteínas Dgt y GlmU mediante fluorescencia polarizada (FP)**

Para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la posible interacción de GlmU y Dgt con el segundo mensajero c-di-GMP, se procedió al empleo de técnicas más precisas y robustas conocidas de forma genérica como Análisis de Interacciones Biomoleculares (BIA, en inglés), que además permiten conocer distintos parámetros de la interacción proteína-ligando.

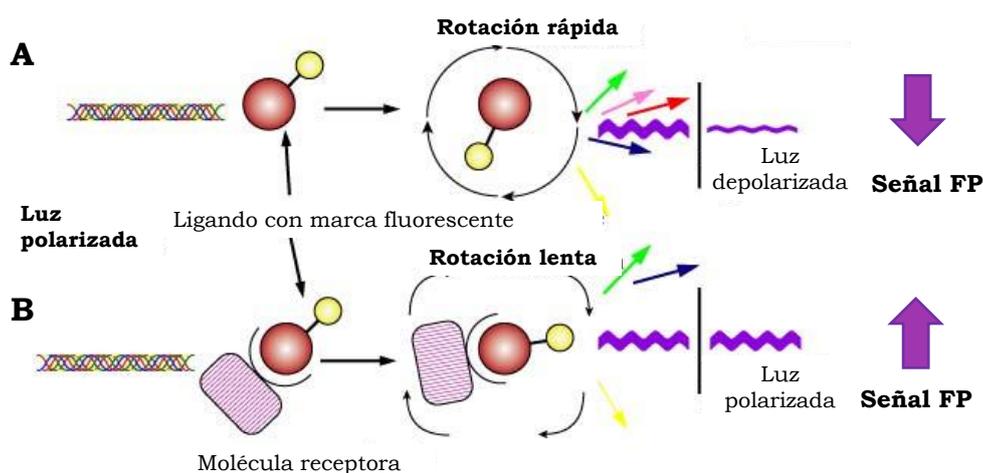
Entre las técnicas BIA podemos destacar la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), muy empleada porque permite conocer la estequiometría, las constantes de equilibrio  $K_A$  y  $K_D$ , la entalpía y la entropía de una reacción bioquímica. Sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de que necesita grandes cantidades de ligando y receptor (Moll *et al.*, 2006b). Otra técnica que está en auge en la última década es la resonancia de plasmones de superficie (SPR), que permite conocer interacciones moleculares en tiempo real con una alta sensibilidad y un escaso consumo de muestra (Hahnefeld *et al.*, 2004). Igualmente entre las BIA, es frecuentemente empleada la fluorescencia polarizada (FP) por sus numerosas ventajas, siendo esta la técnica escogida para corroborar la interacción de GlmU y Dgt con el c-di-GMP.

#### ***3.4.1. Fundamento de la fluorescencia polarizada (FP).***

Es una técnica rápida y fácil que se basa en el empleo de un ligando pequeño marcado con un fluoróforo, el cual puede absorber energía lumínica a una determinada longitud de onda ( $\lambda$ ) para después liberarla a una  $\lambda$  mayor (menos energética). Al excitar una solución acuosa con luz polarizada, las moléculas marcadas con un fluoróforo orientadas paralelamente al haz de luz incidente, entran en un estado de excitación. Durante este tiempo, las moléculas marcadas giran sobre sí mismas emitiendo luz en

distintos planos, resultando en una despolarización de la luz, por lo que, en este caso la señal de FP sería cercana a 0 (Fig. 3.10A). Pero cuando el ligando marcado con el fluoróforo se une a una molécula receptora de mucho mayor tamaño, deja de girar libremente y la luz emitida ocurre en el mismo plano de excitación, dando lugar a una luz polarizada (Fig. 3.10B).

La intensidad de la luz polarizada emitida se correlaciona con la cantidad de ligando marcado unido a la molécula receptora (Jameson & Moczek, 2005; Moll *et al.*, 2006a). Es importante destacar que la señal de FP no depende de la concentración de ligando marcado. Así, mediante la detección de la luz polarizada emitida, se pueden conocer las constantes de asociación ( $K_A$ ) y disociación ( $K_D$ ), así como la afinidad del ligando por la molécula receptora. Como contrapartida, la fluorescencia polarizada presenta el inconveniente de que es necesario el empleo de una molécula marcada con un fluoróforo, pudiendo este influir en la afinidad por el compuesto *per se*.



**Figura 3.10. Fundamento de la fluorescencia polarizada (FP).** En la situación A, el ligando marcado con el fluoróforo gira rápidamente al entrar en el estado de excitación, por lo que la luz emitida ocurre en diferentes planos, provocando la despolarización de la luz. En esta situación la señal de FP es muy baja. En la situación B, cuando el ligando entra en contacto con una molécula receptora, este frena su rotación durante el estado de excitación y como resultado aumenta la luz polarizada.

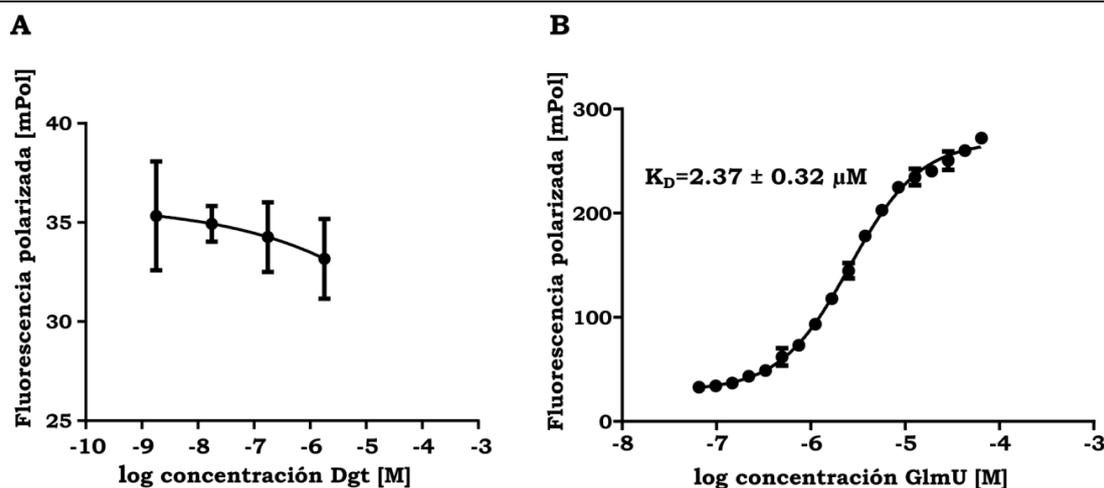
#### 3.4.2. Ensayos de fluorescencia polarizada con Dgt y GlmU

Los experimentos presentados en esta parte de la tesis doctoral se desarrollaron durante una estancia breve en el laboratorio del profesor Friedrich W. Herberg en la Universidad de Kassel (Alemania). El grupo liderado por el Prof. Herberg es especialista en el estudio de las interacciones moleculares de proteínas implicadas en

señalización celular, mediante el empleo de técnicas como la resonancia de plasmones de superficie (SPR) o la fluorescencia polarizada (FP) (Herberg *et al.*, 1994).

Para los ensayos de FP con el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-diGMP, ambas proteínas GlmU y Dgt, se volvieron a purificar empleando el protocolo descrito anteriormente (ver apartado 3.3 de este mismo capítulo o apartado 2.20.3 de la sección Materiales y Métodos). Tras este nuevo proceso de purificación, las cantidades de las proteínas tras su cuantificación por Bradford fueron: 3.52  $\mu\text{M}$  para Dgt y 128.95  $\mu\text{M}$  para GlmU.

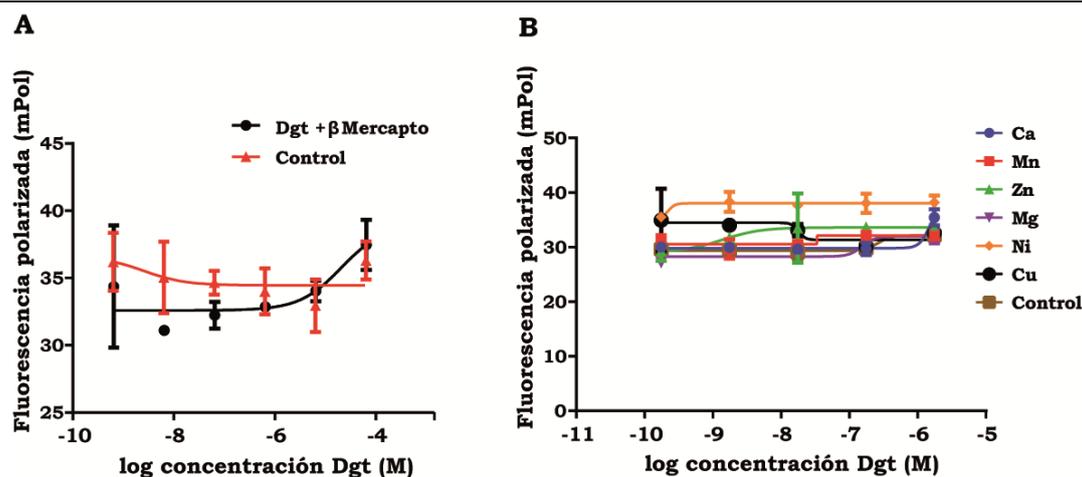
En primer lugar realizamos ensayos directos de FP, en donde concentraciones crecientes de proteína fueron incubadas con una concentración constante del análogo fluorescente del c-di-GMP (5 nM). Todos los ensayos de fluorescencia polarizada se realizaron empleando el tampón FP como diluyente. Tras la medición, se representó gráficamente la señal de FP frente al logaritmo de la concentración proteica empleada. En la figura 3.11, se representan los ensayos de FP para Dgt (A) y GlmU (B). Podemos observar como Dgt no presentó ningún tipo de interacción significativa con el análogo fluorescente del c-di-GMP en las condiciones ensayadas. Observamos, sin embargo, una interacción clara entre GlmU y el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP que sigue una típica curva sigmoidea con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $2.37 \pm 0.32 \mu\text{M}$ . Este valor está en concordancia con los niveles intracelulares de c-di-GMP, que han sido estimados en el rango de micromolar bajo/nanomolar alto (Römling *et al.*, 2013). Además, este valor de  $K_D$  de GlmU era similar a otras proteínas de unión a c-di-GMP, como son FleQ, LapD, Alg44 o CelE (Baraquet & Harwood, 2013; Fang *et al.*, 2014; Merighi *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2009).



**Figura 3.11. Fluorescencia polarizada (FP) de las proteínas Dgt (A) y GlmU (B) empleando el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP.** Se realizaron diluciones seriadas 1/10 para Dgt (1.8  $\mu\text{M}$ , a 180 pM) y diluciones 1/1.5 para el caso de GlmU (64.5  $\mu\text{M}$  a 65.5 nM). La concentración del análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP fue de 5 nM en ambos casos. Se realizaron medidas por triplicado para cada dilución, además de controles con el tampón FP y el fluoróforo solo. Los datos de FP se enfrentaron con el logaritmo de la concentración de proteína, empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

Con el objetivo de comprobar si la falta de unión de Dgt al análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP se debía a unas condiciones desfavorables para dicha interacción, se probó la adición de diferentes compuestos que pudieran favorecerla. Por ejemplo, se probó la incubación de GlmU durante 12 horas con  $\beta$ -mercaptoetanol (3 mM), previo a la interacción. De esta forma, se pretendía evitar las posibles interferencias generadas por puentes di-sulfuro que pudieran perjudicar su unión con el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP (Fig. 3.12A). Igualmente, los cationes divalentes a menudo son necesarios para las interacciones proteína-ligando, especialmente con ligandos de base nucleotídica, estabilizando el complejo formado. Por ello, también decidimos realizar ensayos de FP con la proteína Dgt en presencia de distintos cofactores metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  cada uno (Fig. 3.12B).

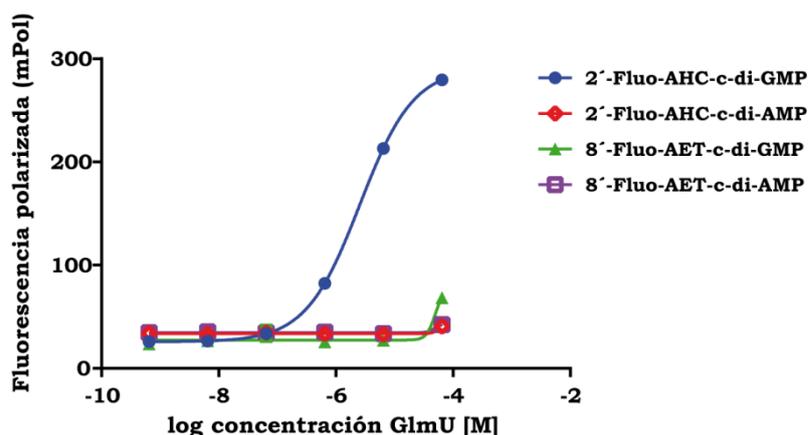
Ni la incubación con  $\beta$ -mercaptoetanol ni la presencia de los cofactores metálicos sirvieron para mejorar la unión de Dgt con el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP (Fig. 3.12).



**Figura 3.12. Fluorescencia polarizada (FP) de la proteína Dgt.** Señal de FP en presencia de 3mM de β-mercaptoetanol (A) y en presencia de 100 μM de los cofactores indicados (B). La concentración de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP fue de 5 nM. Se realizaron medidas por triplicado para cada dilución, además de controles con el tampón FP y el análogo fluorescente en ausencia de proteínas. Los datos de FP se enfrentaron con el logaritmo de la concentración de proteína, empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

Igualmente, decidimos probar la unión de Dgt con otro derivado fluorescente del c-di-GMP que estaba disponible en el laboratorio, el 8-Fluo-AET-c-di-GMP. Utilizando las mismas concentraciones de proteína y ligando empleadas anteriormente, tampoco se pudo observar unión entre Dgt y este otro compuesto (datos no mostrados). La incapacidad para poner de manifiesto la unión de Dgt a ningún tipo de análogo derivado de c-di-GMP en ninguna de las condiciones ensayadas, indicaba que dicha proteína no presenta capacidad de unión a este segundo mensajero.

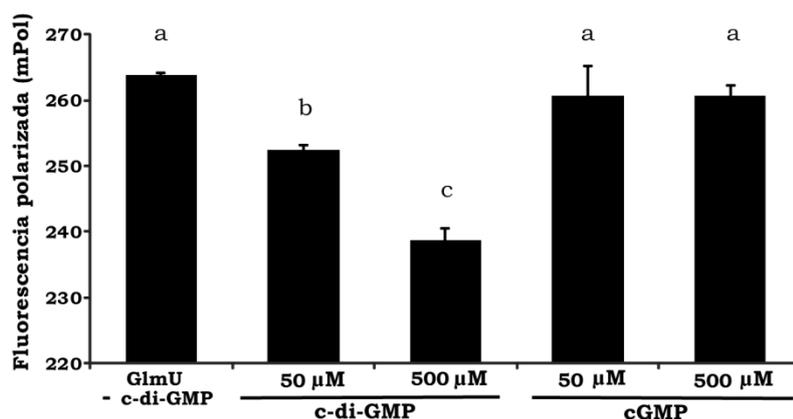
La proteína GlmU, sin embargo, sí mostró interacción con el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP con un valor de  $K_D = 2.37 \mu\text{M}$  (Fig. 3.11B). Para estudiar la especificidad de dicha unión, se realizaron ensayos de FP empleando derivados de c-di-GMP y de c-di-AMP con el mismo grupo Fluo, pero en diferentes posiciones. Diluciones seriadas (1:10) de GlmU se incubaron con los análogos del c-di-GMP y del c-di-AMP a una concentración de 5 nM. En la figura 3.13, se observa que GlmU no unió ninguno de los dos análogos del c-di-AMP ensayados, ni cuando el grupo Fluo se encuentra en posición 2' ni en 8'. Por otra parte, GlmU solo mostró una unión específica por el análogo del c-di-GMP portador del grupo Fluo en posición 2' (Fig. 3.13). El análogo 8'-Fluo-AET-c-di-GMP presenta el grupo Fluo unido al hidrogeno 8' de una de las guaninas, sugiriendo que la modificación en esta posición estaría alterando la unión del c-di-GMP con GlmU.



**Figura 3.13. Fluorescencia polarizada (FP) de la proteína GlnU con diferentes análogos del c-di-GMP y del c-di-AMP.** Diluciones seriadas de GlnU (1:10) desde 64.5  $\mu$ M a 645 pM fueron incubadas con los análogos del c-di-GMP y del c-di-AMP indicados, a una concentración de 5 nM. Se realizaron medidas por triplicado para cada dilución de proteína, además de, controles con el tampón FP y el fluoróforo solos. Las medidas de FP se enfrentaron con el logaritmo de la concentración proteica empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

Igualmente se decidió realizar ensayos de FP competitiva, en donde concentraciones crecientes de c-di-GMP sin marca (500  $\mu$ M a 500 nM) fueron mezclados con 5 nM de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP antes de añadir la proteína GlnU a una concentración final de 20  $\mu$ M. Al igual a lo observado en los ensayos de *dot blot* con la proteína purificada, la señal de fluorescencia polarizada de GlnU no descendía con el incremento de la concentración de c-di-GMP no marcado, indicando que este c-di-GMP no marcado no era capaz de competir con el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP por la unión a GlnU (resultados no mostrados).

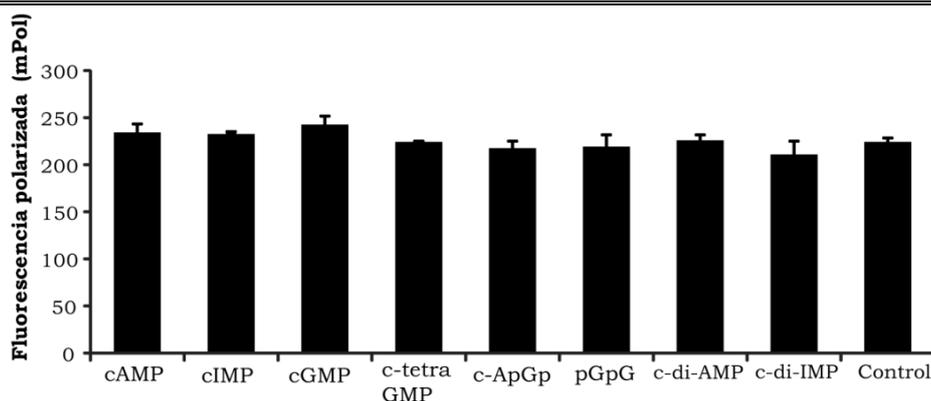
A continuación, se modificó el protocolo de FP competitiva para ver si bajo alguna condición el c-di-GMP era realmente capaz de competir con el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP por unirse a la proteína GlnU. Para ello, en primer lugar realizamos una pre-incubación de la proteína (10  $\mu$ M) con 50 y 500  $\mu$ M de c-di-GMP durante 30 minutos a 4°C, para posteriormente añadir el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP a una concentración de 5 nM y medir la señal de fluorescencia polarizada. Como control negativo, también se incluyó la proteína GlnU con las mismas cantidades de otro nucleótido cíclico (cGMP). En este experimento de FP competitiva, sí que observamos un ligero descenso de la señal de FP dependiente de la concentración de c-di-GMP, en comparación con el control de GlnU sin c-di-GMP. Este descenso dependiente de la concentración no se observó con el nucleótido cíclico cGMP (Fig. 3.14).



**Figura 3.14. Ensayo de fluorescencia polarizada competitiva.** Diferentes concentraciones de c-di-GMP y cGMP (50 y 500  $\mu\text{M}$ ), fueron incubadas durante 30 minutos con 10  $\mu\text{M}$  de GlmU, para posteriormente añadir 5 nM de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP y medir la señal de fluorescencia polarizada. Cada barra representa la media de 3 medidas  $\pm$  el error estándar. Además, se realizaron mediciones del tampón FP y el fluoróforo solos.

A pesar de observar una disminución de la señal de FP dependiente de la concentración de c-di-GMP, era necesaria una gran cantidad de este (hasta 100.000 veces más que de análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP) para observar entre un 5 y un 10% de descenso de la señal de FP. Con estos resultados no era posible concluir que la unión de GlmU al c-di-GMP ocurriese de manera específica.

En la búsqueda de algún competidor para el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP y gracias a la disponibilidad en el laboratorio de diferentes nucleótidos cíclicos, como el cAMP, cIMP, cGMP, c-tetra-GMP, cApGp, pGpG, c-di-AMP o el c-di-IMP, decidimos realizar nuevos ensayos de FP incubando 10  $\mu\text{M}$  de GlmU con todos estos nucleótidos a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ , para observar si alguno de ellos era capaz de competir con el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP en la unión con GlmU. En la figura 3.15 se recogen los datos de este ensayo de FP competitiva, en el que ninguno de los nucleótidos cíclicos ensayados fue capaz de competir con el análogo fluorescente del c-di-GMP, arrojando valores sin diferencia significativa a los obtenidos con el control de GlmU sin ningún nucleótido.



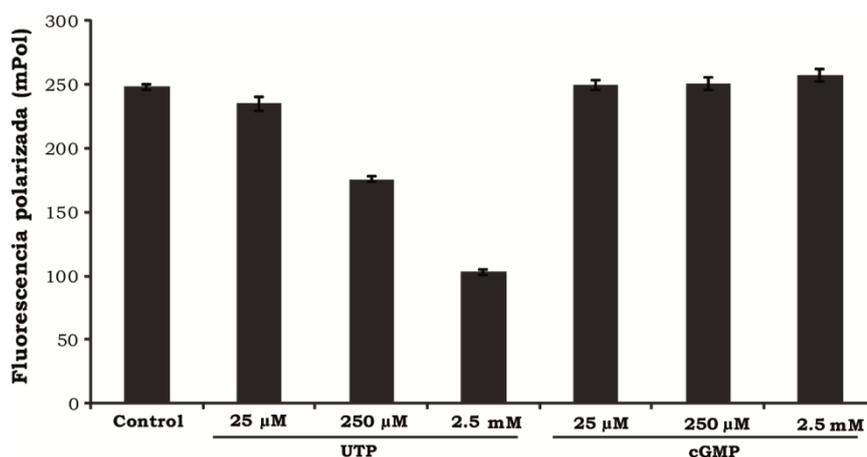
**Figura 3.15. Fluorescencia polarizada competitiva empleando diferentes nucleótidos cíclicos.** 10  $\mu\text{M}$  de GlmU fueron incubados con mezclas de varios nucleótidos cíclicos (50  $\mu\text{M}$ ) y el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP (5 nM). Como control se utilizó la proteína GlmU sin ningún nucleótido. Cada barra representa la media de 3 medidas  $\pm$  el error estándar. Además, se realizaron mediciones del tampón FP y el fluoróforo solos.

Como no pudimos demostrar una unión específica de GlmU con el c-di-GMP ni con ningún otro nucleótido cíclico ensayado, finalmente decidimos comprobar la capacidad de unión de GlmU mediante un ensayo de FP competitiva utilizando como competidor uno de los sustratos de dicha enzima, el UTP (uridina trifosfato). Concentraciones crecientes de UTP (25  $\mu\text{M}$  a 2.5 mM) fueron incubados con 10  $\mu\text{M}$  de GlmU y 5 nM de 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Además, como control negativo también se ensayó el nucleótido cGMP a las mismas concentraciones que el UTP.

Las dos actividades de GlmU, acetiltransferasa y uridiltransferasa, dependen de la presencia de cationes  $\text{Mg}^{2+}$  (Mochalkin *et al.*, 2007; Olsen & Roderick, 2001; Vithani *et al.*, 2014). En *E. coli* y *Yersinia pestis*, se ha estimado como óptima la cantidad de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$  para ambas actividades *in vitro* (Gehring *et al.*, 1996; Patin *et al.*, 2015). Fue por ello que este ensayo de FP con el UTP como competidor, se realizó en presencia de 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ .

En la figura 3.16, se puede observar como el incremento de la cantidad del sustrato UTP provoca un descenso drástico de la señal de FP dependiente de la concentración, no observándose esta tendencia en los controles con el cGMP. El descenso de la señal de FP en presencia de la mayor cantidad de UTP (2.5 mM) es de un 58% en comparación con el control de GlmU sin ningún nucleótido. En este ensayo competitivo, el sustrato UTP consigue desplazar al análogo fluorescente de c-di-GMP, sin embargo la cantidad necesaria fue muy elevada, indicando una mayor afinidad por el análogo fluorescente que por el propio sustrato. Además, de este ensayo se deducía que

el análogo fluorescente del c-di-GMP se ve afectado por el cambio conformacional generado por la unión del UTP al dominio uridiltransferasa de GlnU. De esta forma, la actividad enzimática de GlnU podría estar regulada por c-di-GMP a través del dominio uridiltransferasa.



**Figura 3.16. Fluorescencia competitiva en presencia de UTP.** Alícuotas (10 μM) de GlnU fueron incubadas con mezclas de UTP o cGMP a las concentraciones indicadas (25 μM, 250 μM y 2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) y el análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP (5 nM). Como control se utilizó la proteína GlnU sin ningún nucleótido. Cada barra representa la media de 3 medidas ± el error estándar. Además, se realizaron mediciones del tampón FP y el fluoróforo solos.

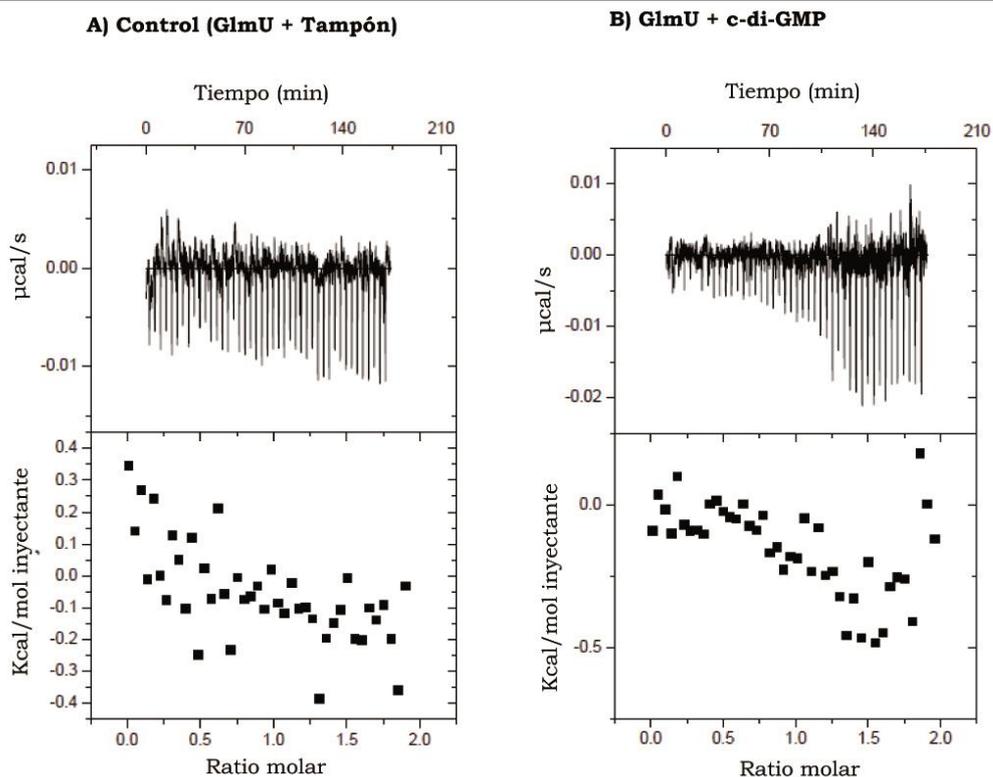
### 3.5. Calorimetría de titulación isotérmica

A pesar de la unión observada de GlnU al análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP, los resultados de FP competitiva muestran que el c-di-GMP no es capaz de competir con el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP por el hipotético sitio de unión de la proteína GlnU. Esto abre la posibilidad de que GlnU solamente reconozca el c-di-GMP cuando se encuentra unido 2'-Fluo-AHC-, o que al menos su afinidad por este análogo sea mucho más alta que por el c-di-GMP libre de marca. Por lo que para poder comprobar si existe una interacción entre GlnU de Ret y el c-di-GMP sin marca, recurrimos a emplear otra técnica BIA como es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés Isothermal Titration Calorimetry). La ITC es una técnica calorimétrica muy precisa que permite cuantificar el calor liberado o absorbido en las interacciones biomoleculares exo- y endotérmicas. En un solo experimento permite determinar todos los parámetros de dicha interacción, como las constantes de equilibrio  $K_A$  y  $K_D$ , la estequiometría, la entropía ( $\Delta S$ ), la entalpía ( $H$ ) y la energía libre ( $\Delta G$ ) (Duff *et al.*, 2011). Si la interacción entre las dos biomoléculas a analizar produce una liberación o absorción de calor, siendo la

---

mayoría de las interacciones proteínas/nucleótidos exotérmicas (Pagano *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012), dicha liberación se produce de forma progresiva durante las primeras inyecciones del ligando, hasta hacerse cercano a cero a medida que la biomolécula se va saturando.

En nuestro caso, el ensayo de ITC consistió en inyecciones secuenciales de 7  $\mu$ l de c-di-GMP a 170  $\mu$ M en una solución 20  $\mu$ M de la proteína GlnU a 20°C (para más información ver la sección Materiales y Métodos). Además, como control se realizaron inyecciones solo del tampón fosfato empleado para diluir tanto la proteína como el c-di-GMP. Al finalizar los experimentos de ITC (3 horas de duración), la proteína GlnU se encontraba precipitada tanto en el ensayo control como con el c-di-GMP (Fig. 3.17 A y B). Esta precipitación de GlnU podría ser la responsable del cambio calorimétrico exotérmico observado en ambos ensayos (control y con c-di-GMP). Sin embargo, la presencia de c-di-GMP, incrementó ligeramente la emisión de calor con respecto al control, además de provocar una precipitación más acusada (datos no mostrados). Por lo tanto, este segundo mensajero podría estar favoreciendo en alguna medida la agregación de GlnU en las últimas fases del experimento, cuando la concentración de c-di-GMP en la muestra era más elevada. En todo caso, la proteína GlnU de Ret no soportaba las condiciones de temperatura (20°C) y agitación (307 rpm) empleadas en los ensayos de ITC, por lo que en base a los resultados obtenidos no podemos concluir si GlnU es ciertamente una proteína efectora capaz de unir c-di-GMP.



**Figura 3.17. Termogramas de la interacción entre GlmU y el c-di-GMP mediante ITC.** Sucesivas inyecciones de 7  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato (control, A) o c-di-GMP a 170  $\mu\text{M}$  (B), se realizaron sobre una solución de GlmU a 20  $\mu\text{M}$ . Gráfica superior: se representa el calor liberado a lo largo del tiempo. Gráfica inferior: calor liberado por mol de inyectante (integral de las inyecciones representadas en la gráfica superior frente a la relación molar de proteína).

---

### **DISCUSIÓN CAPÍTULO 3**

El segundo mensajero c-di-GMP es una molécula clave en la regulación de diversas funciones bacterianas como la motilidad, la formación de biopelículas, la producción de EPS y la virulencia, entre otras (Hengge, 2009; Jenal & Malone, 2006; Römling *et al.*, 2013). Por su importancia clínica y biotecnológica, la investigación en el campo del c-di-GMP se ha centrado en la identificación de proteínas encargadas de la síntesis y degradación de este segundo mensajero. Sin embargo, a pesar de las diversas funciones controladas por c-di-GMP, el número de moléculas efectoras capaces de traducir los niveles intracelulares de este segundo mensajero en una respuesta específica sigue siendo muy escaso. Entre los efectores del c-di-GMP descritos hasta el momento, encontramos moléculas de diversa naturaleza, como proteínas con dominios PilZ, varios factores de transcripción, DGC y PDE con dominios degenerados o incluso moléculas de ARN (*riboswitches*). Hoy en día, gracias al empleo de novedosas metodologías para la búsqueda e identificación de proteínas efectoras, estamos solo al principio del descubrimiento de posibles efectores y las rutas de señalización donde están implicados.

En este capítulo hemos abordado la identificación de nuevas proteínas efectoras del c-di-GMP en el rizobio *Rhizobium etli* CFN42 (Ret). Entre las distintas metodologías descritas hasta el momento, nosotros nos decantamos por la utilizada por Düvel y colaboradores (Düvel *et al.*, 2012). Esta se basa en el empleo de un análogo del c-di-GMP inmovilizado sobre un soporte sólido como es la sefarosa, para el aislamiento de hipotéticas proteínas efectoras capaces de unir c-di-GMP. Es una técnica rápida y sencilla que permite la obtención de muestras enriquecidas en hipotéticas proteínas efectoras para su posterior identificación mediante espectrometría de masas. No obstante, como otros métodos similares, presenta varios hándicaps, como son la aparición de falsos positivos por unión inespecífica con la matriz de sefarosa o la degradación del análogo por PDE presentes en los lisados. Esta metodología basada en la cromatografía de afinidad, ha sido previamente utilizada con éxito en la identificación del interactoma de otros nucleótidos cíclicos como el cGMP (Bertinetti *et al.*, 2009; Scholten *et al.*, 2006). En nuestro estudio se ha utilizado el análogo 2'-AHC-c-di-GMP, que posee un grupo 6-aminohexilcarbamoil unido al 2'-hidroxilo de una de las ribosas y que es eficientemente inmovilizado a la sefarosa a través del grupo amino.

A la hora de inmovilizar pequeñas moléculas, uno de los mayores problemas es la pérdida de la capacidad de unión del ligando. Por lo que es necesario un estudio exhaustivo para mantener intactos aquellos residuos o grupos funcionales involucrados en la interacción. En la molécula de c-di-GMP, el grupo cetona y el nitrógeno en posiciones 6 y 7 respectivamente del anillo de guanina, actúan como aceptores de enlaces de hidrogeno. Además, los grupos fosfato del c-di-GMP también se encuentran implicados en la interacción con algunos residuos aminoacídicos de las proteínas efectoras (Benach *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2004; Chou & Galperin, 2016; Ko *et al.*, 2010; Wassmann *et al.*, 2007). El análogo 2'-AHC-c-di-GMP se encuentra unido a la sefarosa por el grupo 2'-hidroxilo de una de las ribosas, una posición en principio no involucrada en las interacciones c-di-GMP/proteína, por lo que mantendría su capacidad de unión con las moléculas efectoras.

Para la identificación de posibles proteínas efectoras en Ret, se realizaron tres experimentos independientes incubando lisados de esta bacteria con la sefarosa modificada con el análogo del c-di-GMP. Además, y como control de las interacciones inespecíficas, de forma paralela se incubaron los lisados de Ret con sefarosa sin el análogo. Tras la espectrometría de masas, aproximadamente el 50% de las proteínas eluidas de la sefarosa con el análogo también se encontraban en la sefarosa control. La mayoría de estas proteínas contaminantes eran proteínas ribosomales y chaperonas, que por su abundancia relativa en el interior celular habrían quedado unidas de forma inespecífica a la sefarosa. En *P. aeruginosa*, Düvel y colaboradores, también observaron esta tendencia en su trabajo, y es que este es uno de los principales puntos críticos de esta metodología, haciendo imprescindible contar con controles robustos para reducir al máximo la aparición de falsos positivos. En nuestro caso, decidimos ser restrictivos y descartar cualquier proteína que apareciera en alguno de los experimentos control. De esta forma, se obtuvo una lista de 66 proteínas diferentes que no aparecían en los experimentos control y que por tanto eran candidatas a proteínas efectoras del c-di-GMP. De estas 66 proteínas solo 10 aparecieron comunes en los tres experimentos de afinidad, indicando una baja reproducibilidad de la técnica.

En nuestra lista de hipotéticas proteínas efectoras, no se ha encontrado ninguna con dominios PilZ, GGDEF y/o EAL degenerados. La ausencia de proteínas efectoras del c-di-GMP conocidas podría tener distintas explicaciones: i) en *R. etli* no se conocen

las condiciones ni la fase de crecimiento donde se expresan estas proteínas. El crecimiento de Ret para los experimentos de afinidad, fue en medio rico TY y la recogida de las células para la obtención de los lisados, se hizo en una fase estacionaria temprana ( $DO_{600}$  0.8-0.9), pudiendo no darse las condiciones adecuadas para la expresión de dichas proteínas; ii) la abundancia relativa de proteínas con dominios PilZ, GGDEF y EAL en el interior de las bacterias puede ser muy baja en comparación con otros hipotéticos dominios efectores no descritos hasta el momento; iii) la afinidad de estas proteínas por el análogo empleado en la cromatografía de afinidad, puede ser menor o incluso mayor que la afinidad por el propio c-di-GMP. En el primero de los casos, estas proteínas no se unirían al análogo, mientras que en el segundo de los casos las proteínas no serían eluidas al incubar con c-di-GMP no marcado.

También cabe destacar que entre el listado de posibles proteínas efectoras no hemos identificado ninguna relacionada con funciones bacterianas reguladas por c-di-GMP, como motilidad o la producción de EPS. Tampoco se han encontrado proteínas codificadas en los 6 plásmidos o replicones que forman parte del genoma de Ret, por lo que no hay proteínas específicas de los rizobios, sino más bien proteínas con funciones generales ampliamente conservadas en bacterias. Sí se han identificado numerosas proteínas que forman parte de la misma ruta metabólica, como la síntesis de lisina (DapDEF), leucina (LeuBCDS) o purinas (PurFHL), por lo que podría tratarse de complejos proteicos donde solo una de las proteínas es la encargada de unir el c-di-GMP y el resto de proteínas habrían sido arrastradas durante el proceso de elución. Además, se han identificado proteínas que no presentan ninguna relación funcional, pero los genes que las codifican se localizan muy próximos en el genoma. En este último caso podríamos encontrarnos en una región del genoma que estaría activamente transcribiéndose en el momento de recogida de células, bien en respuesta a una determinada señal (regulón) o bien, como una estrategia bacteriana de localizar próximos aquellos genes que van a ser transcritos en un momento dado.

Tras seleccionar 9 de las 66 posibles proteínas efectoras, en base a la presencia de algún dominio de interés, como la posible unión de nucleótidos, los genes de dichas proteínas se sobreexpresaron en *E. coli* para corroborar su unión mediante *dot blot*. Las proteínas de Ret, RHE\_CH02207 y RHE\_CH01767 con dominios PilZ predichos, fueron utilizadas como controles internos y dieron una señal fluorescente positiva,

indicativa de una interacción entre el análogo fluorescente y dichas proteínas a través de su dominio PilZ. Sin embargo la proteína CelA, así como su dominio PilZ (celPilZ), a pesar de que la regulación de la actividad celulosa sintasa está descrita en numerosas especies bacterianas (Fujiwara *et al.*, 2013; Morgan *et al.*, 2013; Omadjela *et al.*, 2013; Ross *et al.*, 1987), no dieron ninguna señal fluorescente en las condiciones ensayadas. Esto podría ser debido a los problemas de expresión presentados, ya que en ambos casos, a pesar de las modificaciones en las condiciones de cultivo, no se pudieron visualizar en geles SDS-PAGE.

En lo que respecta a las 9 proteínas seleccionadas para los experimentos de afinidad con el análogo 2'-AHC-c-di-GMP, solo las proteínas TolB, NdrR, GlmU y Dgt mostraron unos valores de fluorescencia mayores a los de los respectivos controles portando el vector vacío. El resto de proteínas sobreexpresadas presentaban una señal similar o inferior a los controles. Esta ausencia de señal positiva podría tener diferentes explicaciones: i) nos encontramos ante falsos positivos que se han unido de forma inespecífica al análogo del c-di-GMP o a la sefarosa, ii) la sobreexpresión de las proteínas de Ret tiene lugar en *E. coli*, por lo que las condiciones de plegamiento, presencia de cofactores y/u otras proteínas pueden ser diferentes a las presentes en Ret y no ser las adecuadas, iii) algunas proteínas como Alla, no son sobreexpresadas a niveles suficientes en *E. coli* para la detección con el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Para posteriores estudios más detallados decidimos escoger las proteínas GlmU y Dgt por presentar un ratio de fluorescencia comprendido entre los obtenidos con las proteínas de Ret con dominio PilZ, RHE\_CH02207 y RHE\_CH01767. Para eliminar cualquier interferencia con otras proteínas, Dgt y GlmU fueron purificadas para corroborar su unión con el c-di-GMP mediante *dot blot* y fluorescencia polarizada (FP).

La proteína Dgt de Ret mostró una señal positiva en ensayos de *dot blot* empleando el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. Sin embargo, con esta misma técnica al realizar ensayos de competición con c-di-GMP no marcado, Dgt presentó un comportamiento inesperado, pues se incrementaba la fluorescencia con el incremento de c-di-GMP puro. Estos resultados podían sugerir un efecto cooperativo del c-di-GMP, de forma que la unión de una molécula de c-di-GMP facilitara la unión posterior de otras moléculas, recordando al modelo de interacción hemoglobina-oxígeno (Bohr, 1904). Para confirmar estos resultados mostrados en los *dot blot*, decidimos emplear la FP

utilizando el mismo análogo fluorescente 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. En este caso, al contrario a lo observado en los ensayos de *dot blot*, Dgt no presentó ningún tipo de interacción con el análogo del c-di-GMP en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas (proteína sola, incubación con  $\beta$ -mercaptoetanol o con diferentes cofactores metálicos). Estos resultados contradictorios observados para Dgt empleando el mismo análogo del c-di-GMP pero con distinta metodología, llevan a pensar que las diferentes técnicas empleadas pueden sesgar los resultados finales. Así, mientras en el *dot blot* la interacción tiene lugar sobre una superficie sólida (membrana de nitrocelulosa), en FP la interacción ocurriría en una solución acuosa. Basándonos en que Dgt es una proteína soluble sin ningún dominio transmembrana (Singh *et al.*, 2015), tal vez la FP presenta unas condiciones más semejantes a lo que estaría ocurriendo en el interior celular. Sin embargo, con los datos obtenidos no podemos concluir que Dgt no una c-di-GMP, ya que hay que tener en cuenta que los ensayos de afinidad con el análogo 2'-AHC-c-di-GMP se realizaron a partir de lisados de Ret, mientras que los ensayos de unión tanto de *dot blot* como de FP, se han realizado a partir de proteína purificada desde *E.coli* donde tal vez no se den las condiciones de plegamiento, cofactores y/o proteínas necesarias para la interacción con el c-di-GMP.

La proteína GlmU de Ret purificada mostró una señal fluorescente positiva en los ensayos de *dot blot*, siendo esta más intensa que la mostrada por Dgt, indicando una mayor afinidad de GlmU por el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. La interacción entre GlmU y este análogo fluorescente se corroboró mediante FP dando una  $K_D$  (2,37  $\mu$ M) en el rango de micromolar, en concordancia con otras proteínas efectoras previamente descritas (Fang *et al.*, 2014; Hickman & Harwood, 2008; Merighi *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2009). Además, esta interacción es específica para el análogo 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP pues GlmU no presentó interacción con otros análogos fluorescentes del c-di-AMP ni con otros derivados del c-di-GMP con el grupo Fluo en distinta posición. Estos resultados apuntan a que la combinación de la molécula de c-di-GMP junto con la modificación en el hidroxilo 2' de una de las ribosas, son necesarios para la interacción con GlmU. Sin embargo, al igual a lo observado en los *dot blot*, el c-di-GMP sin marcar no era capaz de competir con el análogo fluorescente. Tan solo se observó una cierta disminución (entre un 5% y un 10%) en la interacción de GlmU con el análogo fluorescente mediante una incubación previa de la proteína con el c-di-GMP sin marca.

No obstante, los niveles de c-di-GMP empleados (50 y 500  $\mu\text{M}$ ) para ver dicha disminución, eran muy elevados en comparación con la cantidad de análogo utilizada (5 nM), si bien es cierto que este efecto parece ser específico, ya que la preincubación con cantidades similares de diferentes nucleótidos cíclicos no produjo ningún efecto (Fig. 3.15). Igualmente es interesante reseñar que uno de los sustratos de la enzima, el UTP, pudo competir con el análogo en mayor medida que el c-di-GMP, sugiriendo que la unión del análogo del c-di-GMP a GlnU podría ocurrir a nivel del dominio N-terminal uridiltransferasa.

Desgraciadamente el intento de concluir si GlnU era capaz de unir el c-di-GMP libre marca, mediante calorimetría isoterma de titulación (ITC) fue infructuoso debido a la precipitación de la proteína durante el ensayo. No obstante, los termogramas y grado de precipitación presentados en presencia y ausencia de este segundo mensajero son diferentes, sugiriendo que la presencia de c-di-GMP podría acelerar la formación de agregados de GlnU. Dicha enzima funciona normalmente como trímeros, pero también puede formar hexámeros como una forma de control de la actividad enzimática (Trempe *et al.*, 2011). Los hexámeros se formarían por interacciones entre trímeros, a través del N-terminal, lo que abre la interesante posibilidad que el c-di-GMP pudiera regular la actividad de GlnU controlando su grado de multimerización. A través del empleo de proteína purificada o lisados celulares sería interesante evaluar el efecto de la presencia de c-di-GMP sobre las dos actividades enzimáticas de GlnU.

En este capítulo hemos emprendido el trabajo de identificación de nuevas proteínas efectoras del c-di-GMP en Ret. Sin embargo, no podemos concluir que ninguna de las proteínas identificadas mediante cromatografía de afinidad empleando el análogo 2'-AHC-c-di-GMP realmente sea una proteína efectora. Existen diferentes razones que podrían explicar esta falta de interacción entre las proteínas GlnU y Dgt y el segundo mensajero c-di-GMP: i) la expresión desde la bacteria *E. coli* podría ocasionar plegamientos inadecuados en las proteínas, impidiendo la correcta unión con el c-di-GMP, ii) la ausencia de otras proteínas, cofactores y/o sustratos en *E. coli* o tras el proceso de purificación que sean necesarias para la interacción con c-di-GMP y iii) las moléculas de c-di-GMP podrían unirse a las proteínas GlnU y Dgt en forma de dímeros o alguna forma oligomérica superior, como previamente se ha observado en otras proteínas efectoras (Gentner *et al.*, 2012; Tschowri *et al.*, 2014). Además, Fang y

---

colaboradores (Fang *et al.*, 2014), han ensayado la funcionalidad de distintos análogos del c-di-GMP empleando DRaCALA. Ellos observan que el 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP funciona bien con proteínas efectoras previamente identificadas, pero que genera la aparición de muchos falsos positivos. Mientras que el <sup>33</sup>P-c-di-GMP era más específico aunque también daba lugar a falsos negativos, pues no fue capaz de unirse a algunas proteínas efectoras conocidas.

En resumen, la combinación de factores como la posible necesidad de proteínas coadyuvantes que pudieron estar presentes en los extractos celulares utilizados para la cromatografía de afinidad pero no posteriormente; un inadecuado plegamiento en *E. coli*, junto con el uso de un análogo de c-di-GMP en la cromatografía de afinidad, diferente del derivado fluorescente empleado posteriormente, podrían explicar que no haya sido posible demostrar la unión específica de c-di-GMP a ninguna de las proteínas seleccionadas. El empleo de diferentes condiciones de cultivo de las bacterias para la producción de los extractos proteicos para la cromatografía de afinidad, así como la sobreexpresión de las proteínas candidatas en la bacteria *Ret* en lugar de *E. coli*, junto con el uso de diferentes derivados de c-di-GMP, podrían proporcionar condiciones más propicias para la identificación de nuevos efectores de c-di-GMP en *R. etli*.

### **Anexos capítulo 3**

#### **3.1. Construcción de plásmidos para la sobreexpresión de posibles proteínas efectoras.**

Para llevar a cabo la sobreexpresión de las posibles proteínas con capacidad de unión a c-di-GMP, identificadas previamente mediante cromatografía de afinidad y posterior espectrometría de masas, se emplearon los vectores pQE-80L o pET-28b(+). En todos los casos, para la amplificación se utilizó ADN genómico de *Rhizobium etli* CFN42 previamente aislado y purificado mediante kit en el laboratorio.

##### ***3.1.1. Construcción del plásmido pQE80-dgt***

Para la amplificación completa del gen *dgt* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

dgtF: 5' TTTAGGATCCACGGTTGACAGACGGGCT

dgtR: 5' ACCTAAGCTTCGCTGCCTATCGCAAATC

Una vez obtenido el producto de PCR de 1241 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

##### ***3.1.2. Construcción del plásmido pQE80-surE***

Para la amplificación completa del gen *surE* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

surEF: 5' CTTTGGATCCCGCATCCTGCTTACGAAT

surER: 5' ACCCAAGCTTTCAAACCTGTGCTCCGTA

Una vez obtenido el producto de PCR de 791 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

##### ***3.1.3. Construcción del plásmido pQE80-glmU***

Para la amplificación completa del gen *glmU* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

glmUF: 5' TTAGGATCCGAACGTACTTGTCTTGCC

glmUR: 5' ACCCAAGCTTTC AAGCCTCGGCCTTTTTC

Una vez obtenido el producto de PCR de 791 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los cebadores) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

#### **3.1.4. Construcción del plásmido pQE80-nrdR**

Para la amplificación completa del gen *nrdR* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

nrdRF: 5' AAATGGATCCCGCTGCCCTATTGCGGTTC

nrdRR: 5' AGCCAAGCTTTCATCTGTCCAGCGGGTC

Una vez obtenido el producto de PCR de 494 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

#### **3.1.5. Construcción del plásmido pQE80-*allA***

Para la amplificación completa del gen *allA* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

allAF: 5' ACCTGGATCCCTTGCCCGAATTTCTCGAC

allAR: 5' AATCAAGCTTTCATGGCGCTGGCTCTTTG

Una vez obtenido el producto de PCR de 521 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

#### **3.1.6. Construcción del plásmido pQE80-*pgi***

Para la amplificación completa del gen *pgi* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

pgiF: 5' CTTAGGATCCAACGCCATCGTCGAACAG

pgiR: 5' AATCGGTACCCTATTTTCGCGAGCTTCGC

Una vez obtenido el producto de PCR de 1643 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.7. Construcción del plásmido pQE80-clpX**

Para la amplificación completa del gen *clpX* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

clpXF: 5' AATCGGATCCAGCAAGGTCAGCGGCAGC

clpXR: 5' TAATAAAGCTTTCACGCCGAAGCGTTGGC

Una vez obtenido el producto de PCR de 1295 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.8. Construcción del plásmido pQE80-tolB**

Para la amplificación completa del gen *tolB* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

tolBF: 5' CGTAGGATCCGTC AAGTGTTCCCTCATC

tolBR: 5' TACCAAGCTTCTACTCCAGCAGCGGTGAC

Una vez obtenido el producto de PCR de 1328 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.9. Construcción del plásmido pQE80-aroA**

Para la amplificación completa del gen *aroA* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

aroAF: 5' ATTAGAGCTCACACGCACCGCCAAACTC

aroAR: 5' ACCCAAGCTTTC AATCCTTGCCCGATAG

Una vez obtenido el producto de PCR de 1280 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de

restricción *SacI* y *HindIII* (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.10. Construcción del plásmido pET28*celA***

Para la amplificación completa del gen *celA* de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

celAF: 5' ATTTGAGCTCGCCCCGGGGTAACTGACGG

celAR: 5' TTCTAACGCGGCCGCTCATCCGGCATTGACCTTTG

Una vez obtenido el producto de PCR de 2270 pb, se añadieron extremos 3'-dA incubando el fragmento con una polimerasa sin corrección de errores y dATP. Tras la purificación del fragmento mediante electroelución, se clonó en el vector pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> dando lugar al plásmido TOPO*celA*. A continuación, este vector se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *NotI* (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) para obtener el fragmento que contenía el gen *celA*, el cual se ligó con el vector pET-28b (+), previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.11. Construcción del plásmido pQE80-*celPilZ***

Para la sobreexpresión del dominio PilZ de la celulosa sintasa CelA de *Rhizobium etli* CFN42, se amplificaron los últimos 173 aminoácidos de los 748 totales que presenta la proteína. Aunque además del ADN correspondiente al dominio PilZ se amplificó un fragmento extra correspondiente a un pequeño fragmento transmembrana, según el programa SOSUI la proteína formada no iría a membrana. Se emplearon los siguientes oligonucleótidos específicos:

celPilZF: 5' TAAAGGATCCCTTGGCGTCGTGTCGGAAC

celPilZR: 5' ACCCAAGCTTTCATCCGGCATTGACCTTTG

Una vez obtenido el producto de PCR de 542 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.12. Construcción del plásmido pQE80-1767**

Para la amplificación completa del gen RHE\_CH01767 de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

pilZF: 5' AGTCGAGCTCACCCGAAACCTGAAAATC

pilZR: 5' CGGGAAGCTTGAGATAGTCTTGAAGCG

Una vez obtenido el producto de PCR de 591 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII* (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

### **3.1.13. Construcción del plásmido pQE80-2207**

Para la amplificación completa del gen RHE\_CH02207 de *Rhizobium etli* CFN42 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos:

pilZ22-F: 5' TTTAGGATCCCCTCGTTCCAGCCAGCTC

pilZ22-R: 5' ACCCAAGCTTAAGCTGTCAAAGAAATTCGC

Una vez obtenido el producto de PCR de 635 pb, se procedió a su purificación mediante electroelución. A continuación se digirió el fragmento con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (subrayadas en la secuencia de los oligonucleótidos) y se ligó con el vector pQE-80L, previamente digerido con ambas enzimas.

# **CONCLUSIONS**



1. The artificial increments of intracellular c-di-GMP content in various symbiotic or pathogenic plant-interacting bacteria, result in common free-living responses including reduction of motility, increased production of exopolysaccharides, flocculation in liquid media and enhanced biofilm formation.
2. In rhizobia-legumes interactions, increased intracellular c-di-GMP levels may produce contrasting effects, depending on the specific plant-bacteria association and the stage of the symbiotic interaction considered. In general, the early stages of the interaction are favoured since enhanced adhesion to plant roots, but the symbiotic efficiency can be decreased, especially in the *R. etli*-*P.vulgaris* interaction, with less nodulation and reduced aerial biomass and nitrogen content of plants.
3. Mini-Tn7 delivery vectors for the integration and stable expression of the *pleD\** gene in different plant-interacting bacterial genomes, are useful to artificially increase the intracellular levels of c-di-GMP, similar to plasmid-borne *pleD\** (pJBpleD\*). However, the higher stability of mini-Tn7 constructions makes them preferred tools under conditions where a selective pressure cannot be applied. Moreover, *pleD\** expression can be regulated by the inducible LacI<sup>q</sup>/IPTG system, allowing modulation of the c-di-GMP levels and its associated phenotypes on demand.
4. The EPS cellulose and Mixed-Linkage  $\beta$ -Glucan (MLG) contribute synergistically to the CR<sup>+</sup> and CF<sup>+</sup> phenotypes of *R. etli* upon increasing the c-di-GMP intracellular content. However, cellulose seems the main EPS involved in flocculation and biofilm formation, as well as adhesion of bacteria to both abiotic and biotic surfaces, in response to elevated c-di-GMP levels.
5. Overproduction of cellulose and MLG by *R. etli* does not explain the lower symbiotic efficiency observed at high intracellular c-di-GMP levels, suggesting that c-di-GMP negatively affects other functions important for symbiosis. Moreover, production of either one of those EPS may be important for normal nodule infection, as deduced from the abnormal infection pattern shown by a *celAB*<sup>-</sup>/*bgsA*<sup>-</sup> double mutant at high c-di-GMP levels.
6. The large number of false positives brought about by the chemical proteomics approach followed in this thesis, highlight the inefficiency of this and others so-called

## Conclusions

---

high throughput approaches for the identification of c-di-GMP protein effectors. Several drawbacks have been identified which should be considered to improve the efficiency of these methods.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdian, P. L., Caramelo, J. J., Ausmees, N. & Zorreguieta, A. (2013).** RapA2 is a calcium-binding lectin composed of two highly conserved cadherin-like domains that specifically recognize *Rhizobium leguminosarum* acidic exopolysaccharides. *J Biol Chem* **288**, 2893-2904.
- Abergel, C., Bouveret, E., Claverie, J. M., Brown, K., Rigal, A., Lazdunski, C. & Benedetti, H. (1999).** Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* **7**, 1291-1300.
- Aguilar, O. M., Reilander, H., Arnold, W. & Puhler, A. (1987).** *Rhizobium meliloti* *nifN* (*fixF*) gene is part of an operon regulated by a *nifA*-dependent promoter and codes for a polypeptide homologous to the *nifK* gene product. *J Bacteriol* **169**, 5393-5400.
- Aldridge, P., Paul, R., Goymer, P., Rainey, P. & Jenal, U. (2003).** Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol* **47**, 1695-1708.
- Alm, R. A., Boder, A. J., Free, P. D. & Mattick, J. S. (1996).** Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**, 46-53.
- Amikam, D., Steinberger, O., Shkolnik, T. & 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. *BiochemJ* **311** ( Pt 3), 921-927.
- Amikam, D. & Galperin, M. Y. (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3-6.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998).** The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**, 469-472.
- Aravind, L. & 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.
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. & Lindberg, M. (1999).** Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **145** ( Pt 5), 1253-1262.
- Ausmees, N., Jacobsson, K. & Lindberg, M. (2001a).** A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **147**, 549-559.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. & Lindberg, M. (2001b).** Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 163-167.

**Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. (1991).** Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet* **228**, 113-124.

**Baev, N., Schultze, M., Barlier, I., Ha, D. C., Virelizier, H., Kondorosi, E. & Kondorosi, A. (1992).** *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common nod genes: *nodM* encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. *J. Bacteriol* **174**, 7555-7565.

**Bai, Y., Yang, J., Zhou, X., Ding, X., Eisele, L. E. & Bai, G. (2012).** *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP. *PLoS One* **7**, e35206.

**Bao, Y., Lies, D. P., Fu, H. & Roberts, G. P. (1991).** An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* **109**, 167-168.

**Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. & Harwood, C. S. (2012).** The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40**, 7207-7218.

**Baraquet, C. & 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 U S A* **110**, 18478-18483.

**Barends, T. R., Hartmann, E., Griese, J. J. & other authors (2009).** Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**, 1015-1018.

**Barnes, R. J., Leung, K. T., Schraft, H. & Ulanova, M. (2008).** Chromosomal *gfp* labelling of *Pseudomonas aeruginosa* using a mini-Tn7 transposon: application for studies of bacteria-host interactions. *CanJ. Microbiol* **54**, 48-57.

**Barnhart, D. M., Su, S., Baccaro, B. E., Banta, L. M. & 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.

**Barnhart, D. M., Su, S. & Farrand, S. K. (2014).** A signaling pathway involving the diguanylate cyclase CelR and the response regulator DivK controls cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **196**, 1257-1274.

**Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2009).** Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J Bacteriol* **191**, 7333-7342.

- Bassis, C. M. & Visick, K. L. (2010).** The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **192**, 1269-1278.
- Beauchamp, B. B. & Richardson, C. C. (1988).** A unique deoxyguanosine triphosphatase is responsible for the optA1 phenotype of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2563-2567.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. & Ielpi, L. (1998).** Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 145-152.
- Becker, A., Ruberg, S., Baumgarth, B., Bertram-Drogatz, P. A., Quester, I. & Puhler, A. (2002).** Regulation of succinoglycan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 187-190.
- Becker, A. (2015).** Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol* **6**, 687.
- Benach, J., Swaminathan, S. S., Tamayo, R. & other authors (2007).** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J* **26**, 5153-5166.
- Beringer, J. E. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *JGen. Microbiol* **84**, 188-198.
- Berti, P. J. & Chindemi, P. (2009).** Catalytic residues and an electrostatic sandwich that promote enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (AroA) catalysis. *Biochemistry* **48**, 3699-3707.
- Bertinetti, D., Schweinsberg, S., Hanke, S. E., Schwede, F., Bertinetti, O., Drewianka, S., Genieser, H.-G. & Herberg, F. W. (2009).** Chemical tools selectively target components of the PKA system. *BMC Chemical Biology* **9**, 1-15.
- Bever, J. D. & Simms, E. L. (2000).** Evolution of nitrogen fixation in spatially structured populations of *Rhizobium*. *Heredity (Edinb)* **85 Pt 4**, 366-372.
- Beyhan, S., Odell, L. S. & 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. & 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.
- Bladergroen, M. R. & Spaink, H. P. (1998).** Genes and signal molecules involved in the *rhizobia-leguminosae* symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 353-359.

- Blankenfeldt, W., Kuzin, A. P., Skarina, T., Korniyenko, Y., Tong, L., Bayer, P., Janning, P., Thomashow, L. S. & Mavrodi, D. V. (2004).** Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16431-16436.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K. & 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.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H. & other authors (2010).** Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**, 107-116.
- Bohr, C., Hasselbach, K. A., and Krogh, A. (1904).** Über einen in biologischen Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlen-sauerspannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Arch Physiol* **15**, 401–412.
- Bolton, E., Glynn, P. & O'Gara, F. (1984).** Site specific transposition of Tn7 into a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. *Molec. Gen. Genet* **193**, 153-157.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Yanku, M., Schreiber, R., Gust, B., Chater, K., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. (2004).** Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**, 1022-1035.
- Box, J. & Noel, K. D. (2011).** Controlling the expression of rhizobial genes during nodule development with elements and an inducer of the *lac* operon. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 478-486.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *AnalBiochem* **72**, 248-254.
- Bravo, A. & Mora, J. (1988).** Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J Bacteriol* **170**, 980-984.
- Breedveld, M. W. & Miller, K. J. (1994).** Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol Rev* **58**, 145-161.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M. & other authors (2003).** The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10181-10186.
- Burton, E., Gawande, P. V., Yakandawala, N., LoVetri, K., Zhanel, G. G., Romeo, T., Friesen, A. D. & Madhyastha, S. (2006).** Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1835-1840.

---

**Calos, M. P. (1978).** DNA sequence for a low-level promoter of the *lac* repressor gene and an 'up' promoter mutation. *Nature* **274**, 762-765.

**Canonaco, F., Hess, T. A., Heri, S., Wang, T., Szyperski, T. & Sauer, U. (2001).** Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 247-252.

**Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J. & other authors (2001).** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9877-9882.

**Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I. M., Lugtenberg, B. J., Spaink, H. P., Rademaker, G. J., Haverkamp, J. & Thomas-Oates, J. E. (1995).** Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol Biol* **29**, 453-464.

**Carlson, R. W., Reuhs, B., Chen, T. B., Bhat, U. R. & Noel, K. D. (1995).** Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. *J Biol Chem* **270**, 11783-11788.

**Clavel, T., Germon, P., Vianney, A., Portalier, R. & Lazzaroni, J. C. (1998).** TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol Microbiol* **29**, 359-367.

**Crepin, S., Harel, J. & Dozois, C. M. (2012).** Chromosomal complementation using tn7 transposon vectors in *enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6001-6008.

**Cuppels, D. A. (1986).** Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 323-327.

**Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. & Schirmer, T. (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17084-17089.

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

**Chen, L. H., Koseoglu, V. K., Guvener, Z. T., Myers-Morales, T., Reed, J. M., D'Orazio, S. E., Miller, K. W. & Gomelsky, M. (2014).** Cyclic di-GMP-dependent signaling pathways in the pathogenic Firmicute *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* **10**, e1004301.

**Chen, Z. H. & 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. & other authors (2010).** The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* **396**, 646-662.
- Choi, K. H., Gaynor, J. B., White, K. G., López, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. & Schweizer, H. P. (2005).** A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**, 443-448.
- Choi, K. H., DeShazer, D. & Schweizer, H. P. (2006).** mini-Tn7 insertion in bacteria with multiple glmS-linked *attTn7* sites: example *Burkholderia mallei* ATCC 23344. *Nat. Protoc* **1**, 162-169.
- Choi, K. H. & Schweizer, H. P. (2006a).** mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc* **1**, 153-161.
- Choi, K. H. & Schweizer, H. P. (2006b).** mini-Tn7 insertion in bacteria with secondary, non-glmS-linked *attTn7* sites: example *Proteus mirabilis* HI4320. *Nat. Protoc* **1**, 170-178.
- Chou, S. H. & Galperin, M. Y. (2016).** Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J Bacteriol* **198**, 32-46.
- Choy, W. K., Zhou, L., Syn, C. K., Zhang, L. H. & 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, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M. & Jenal, U. (2006).** Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol.Chem* **281**, 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. (2005).** Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**, 30829-30837.
- D'Argenio, D. A. & Miller, S. I. (2004).** Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* **150**, 2497-2502.
- Dahlstrom, K. M., Giglio, K. M., Collins, A. J., Sondermann, H. & O'Toole, G. A. (2015).** Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector. *MBio* **6**.
- Danhorn, T. & Fuqua, C. (2007).** Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 401-422.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004).** *Quorum sensing* and *swarming* migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 261-289.

- Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H. & other authors (2006).** Quorum signal molecules as biosurfactants affecting *swarming* in *Rhizobium etli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **103**, 14965-14970.
- Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Abe, M. & Pankratz, S. H. (1984).** Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1140-1150.
- DeBoy, R. T. & Craig, N. L. (2000).** Target site selection by Tn7: *attTn7* transcription and target activity. *J. Bacteriol* **182**, 3310-3313.
- Deinema, M. H. & Zevenhuizen, L. P. (1971).** Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Arch. Mikrobiol* **78**, 42-51.
- Demarre, G., Guerout, A. M., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D. A., Marliere, P. & Mazel, D. (2005).** A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalph) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res. Microbiol* **156**, 245-255.
- den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K. & Buttner, M. J. (2010).** Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **78**, 361-379.
- Dennis, J. J. & 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.
- Dombrecht, B., Marchal, K., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2002).** Prediction and overview of the RpoN-regulon in closely related species of the Rhizobiales. *Genome Biol* **3**, Research0076.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B. & Jenal, U. (2009).** Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* **23**, 93-104.
- Duff, M. R., Jr., Grubbs, J. & Howell, E. E. (2011).** Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity. *J Vis Exp*.
- Düvel, J., Bertinetti, D., Moller, S. & other authors (2012).** A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **88**, 229-236.
- Edmunds, A. C., Castiblanco, L. F., Sundin, G. W. & Waters, C. M. (2013).** Cyclic Di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora*. *J Bacteriol* **195**, 2155-2165.

**Ely, B. (1982).** Transposition of Tn7 occurs at a single site on the *Caulobacter crescentus* chromosome. *J Bacteriol* **151**, 1056-1058.

**Evans, L. R. & Linker, A. (1973).** Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **116**, 915-924.

**Fang, X., Ahmad, I., Blanka, A., Schottkowski, M., Cimdins, A., Galperin, M. Y., Römling, U. & Gomelsky, M. (2014).** GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol* **93**, 439-452.

**Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K., Dow, J. M., Givskov, M., Ryan, R. P. & 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.

**Feirer, N., Xu, J., Allen, K. D., Koestler, B. J., Brugger, E. L., Waters, C. M., White, R. H. & Fuqua, C. (2015).** A Pterin-Dependent Signaling Pathway Regulates a Dual-Function Diguanylate Cyclase-Phosphodiesterase Controlling Surface Attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *MBio* **6**, e00156.

**Ferreira, R. B., Antunes, L. C., Greenberg, E. P. & 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.

**Fineran, P. C., Williamson, N. R., Lilley, K. S. & 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.

**Forsberg, L. S. & Carlson, R. W. (1998).** The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **273**, 2747-2757.

**Foucher, F. & Kondorosi, E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* **43**, 773-786.

**Frayse, N., Couderc, F. & Poinso, V. (2003).** Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**, 1365-1380.

**Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L. & Hirsch, A. M. (2006).** Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 195-206.

**Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. & Hirsch, A. M. (2008).** *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* **67**, 504-515.

- Fujiwara, T., Komoda, K., Sakurai, N., Tajima, K., Tanaka, I. & 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.
- Gage, D. J. (2002).** Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 7042-7046.
- Gage, D. J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 280-300.
- Galperin, M. Y., Higdon, R. & Kolker, E. (2010).** Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst* **6**, 721-728.
- Gao, S., Romdhane, S. B., Beullens, S., Kaefer, V., Lambrichts, I., Fauvart, M. & Michiels, J. (2014).** Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in *Rhizobium etli*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C. & Lasa, I. (2004).** Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**, 264-277.
- Gawel, D., Hamilton, M. D. & Schaaper, R. M. (2008).** A novel mutator of *Escherichia coli* carrying a defect in the *dgt* gene, encoding a dGTP triphosphohydrolase. *J Bacteriol* **190**, 6931-6939.
- Gehring, A. M., Lees, W. J., Mindiola, D. J., Walsh, C. T. & Brown, E. D. (1996).** Acetyltransfer precedes uridylyltransfer in the formation of UDP-N-acetylglucosamine in separable active sites of the bifunctional GlmU protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **35**, 579-585.
- Gentner, M., Allan, M. G., Zaehring, F., Schirmer, T. & Grzesiek, S. (2012).** Oligomer formation of the bacterial second messenger c-di-GMP: reaction rates and equilibrium constants indicate a monomeric state at physiological concentrations. *J Am Chem Soc* **134**, 1019-1029.
- Gil-Serrano, A., González-Jiménez, I., Tejero-Mateo, P. & Sánchez del Junco, A. (1992).** Structure of the acidic exopolysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli CFN42. *Carbohydr Res* **225**, 169-174.
- Girard, L., Brom, S., Davalos, A., López, O., Soberon, M. & Romero, D. (2000).** Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1283-1292.
- Glazebrook, J. & Walker, G. C. (1989).** A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* **56**, 661-672.

**Glenn, S. A., Gurich, N., Feeney, M. A. & Gonzalez, J. E. (2007).** The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**, 7077-7088.

**Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A. & other authors (2013).** Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11541-11546.

**González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M. A. & other authors (2003).** The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* **4**, R36.

**González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P. & other authors (2006).** The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **103**, 3834-3839.

**Goormachtig, S., Capoen, W. & Holsters, M. (2004).** *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends Plant Sci* **9**, 518-522.

**Goymer, P., Kahn, S. G., Malone, J. G., Gehrig, S. M., Spiers, A. J. & 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.

**Grinberg, I., Shteinberg, T., Gorovitz, B., Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Borovok, I. (2006).** The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *J Bacteriol* **188**, 7635-7644.

**Habazettl, J., Allan, M. G., Jenal, U. & Grzesiek, S. (2011).** Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J.Biol.Chem* **286**, 14304-14314.

**Hahnefeld, C., Drewianka, S. & Herberg, F. W. (2004).** Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Mol Med* **94**, 299-320.

**Hansen, T. & Schonheit, P. (2005).** *Escherichia coli* phosphoglucose isomerase can be substituted by members of the PGI family, the PGI/PMI family, and the cPGI family. *FEMS Microbiol Lett* **250**, 49-53.

**Haynes, J. G., Czymbek, K. J., Carlson, C. A., Veereshlingam, H., Dickstein, R. & Sherrier, D. J. (2004).** Rapid analysis of legume root nodule development using confocal microscopy. *New Phytologist* **163**, 661-668.

**He, Y. W., Ng, A. Y., Xu, M., Lin, K., Wang, L. H., Dong, Y. H. & 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.
- Hengge, R. (2010).** Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal* **3**, pe44.
- Herberg, F. W., Dostmann, W. R., Zorn, M., Davis, S. J. & Taylor, S. S. (1994).** Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation. *Biochemistry* **33**, 7485-7494.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B. & Boddey, R. M. (2008).** Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* **311**, 1-18.
- Hickman, J. W. & Harwood, C. S. (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**, 376-389.
- Hobley, L., Fung, R. K., Lambert, C. & other authors (2012).** Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathog* **8**, e1002493.
- Huangyutitham, V., Guvener, Z. T. & Harwood, C. S. (2013).** Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *MBio* **4**, e00242-00213.
- Hubscher, U., Lutz, H. & Kornberg, A. (1980).** Novel histone H2A-like protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5097-5101.
- Hunter, J. L., Severin, G. B., Koestler, B. J. & Waters, C. M. (2014).** The *Vibrio cholerae* diguanylate cyclase VCA0965 has an AGDEF active site and synthesizes cyclic di-GMP. *BMC Microbiol* **14**, 22.
- Ielpi, L., Dylan, T., Ditta, G. S., Helinski, D. R. & Stanfield, S. W. (1990).** The ndvB locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of beta-(1-2)-glucan. *J Biol Chem* **265**, 2843-2851.
- Itoh, Y., Rice, J. D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., Beveridge, T. J., Preston, J. F., 3rd & Romeo, T. (2008).** Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J Bacteriol* **190**, 3670-3680.
- Jain, R., Behrens, A. J., Kaefer, V. & Kazmierczak, B. I. (2012).** Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations. *J Bacteriol* **194**, 4285-4294.

**Jameson, D. M. & Mocz, G. (2005).** Fluorescence polarization/anisotropy approaches to study protein-ligand interactions: effects of errors and uncertainties. *Methods Mol Biol* **305**, 301-322.

**Janczarek, M. & Skorupska, A. (2001).** The *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii *pssB* gene product is an inositol monophosphatase that influences exopolysaccharide synthesis. *Arch Microbiol* **175**, 143-151.

**Jansson, P. E., Kenne, L. & Lindberg, B. (1975).** Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* **45**, 275-282.

**Jenal, U. & Malone, J. (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu.Rev.Genet* **40**, 385-407.

**Jittawuttipoka, T., Buranajitpakorn, S., Fuangthong, M., Schweizer, H. P., Vattanaviboon, P. & Mongkolsuk, S. (2009).** Mini-Tn7 vectors as genetic tools for gene cloning at a single copy number in an industrially important and phytopathogenic bacteria, *Xanthomonas* spp. *FEMS MicrobiolLett* **298**, 111-117.

**Jones, C. J., Ryder, C. R., Mann, E. E. & Wozniak, D. J. (2013).** AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *J Bacteriol* **195**, 1637-1644.

**Jones, C. J., Utada, A., Davis, K. R., Thongsomboon, W., Zamorano Sanchez, D., Banakar, V., Cegelski, L., Wong, G. C. & Yildiz, F. H. (2015).** C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog* **11**, e1005068.

**Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. (2007).** How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619-633.

**Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B. T. & Sintim, H. O. (2013).** Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem.Soc.Rev.* **42**, 305-341.

**Karaolis, D. K., Newstead, M. W., Zeng, X., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Bhan, U., Liang, H. & Standiford, T. J. (2007).** Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect Immun* **75**, 4942-4950.

**Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W. & other authors (2015).** Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* **523**, 308-312.

**Kearns, D. B. (2010).** A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634-644.

- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protocols* **10**, 845-858.
- Klebensberger, J., Lautenschlager, K., Bressler, D., Wingender, J. & Philipp, B. (2007).** Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environ Microbiol* **9**, 2247-2259.
- Ko, J., Ryu, K. S., Kim, H., Shin, J. S., Lee, J. O., Cheong, C. & Choi, B. S. (2010).** Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by Pilz domain proteins. *J Mol Biol* **398**, 97-110.
- Koch, B., Jensen, L. E. & Nybroe, O. (2001).** A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J. Microbiol. Methods* **45**, 187-195.
- Kondo, N., Kuramitsu, S. & Masui, R. (2004).** Biochemical characterization of TT1383 from *Thermus thermophilus* identifies a novel dNTP triphosphohydrolase activity stimulated by dATP and dTTP. *J Biochem* **136**, 221-231.
- Koseoglu, V. K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Guvener, Z. T., Lehmann, T. E., Miller, K. W. & Gomelsky, M. (2015).** *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Mol Microbiol* **96**, 728-743.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-176.
- Krasteva, P. V., Fong, J. C., Shikuma, N. J., Beyhan, S., Navarro, M. V., Yildiz, F. H. & Sondermann, H. (2010).** *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* **327**, 866-868.
- Krasteva, P. V., Giglio, K. M. & Sondermann, H. (2012).** Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci.* **21**, 929-948.
- Krol, J., Wielbo, J., Mazur, A., Kopcinska, J., Lotocka, B., Golinowski, W. & Skorupska, A. (1998).** Molecular characterization of *pssCDE* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain TA1: *pssD* mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1142-1148.
- Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M. & 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.

## Bibliografía

---

**Kumar, A., Dalton, C., Cortez-Cordova, J. & Schweizer, H. P. (2010).** Mini-Tn7 vectors as genetic tools for single copy gene cloning in *Acinetobacter baumannii*. *J. Microbiol. Methods* **82**, 296-300.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Lambertsen, L., Sternberg, C. & Molin, S. (2004).** Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* **6**, 726-732.

**Laus, M. C., van Brussel, A. A. & Kijne, J. W. (2005).** Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 533-538.

**Laus, M. C., Logman, T. J., Lamers, G. E., Van Brussel, A. A., Carlson, R. W. & Kijne, J. W. (2006).** A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol Microbiol* **59**, 1704-1713.

**Laventie, B. J., Nesper, J., Ahrne, E., Glatter, T., Schmidt, A. & Jenal, U. (2015).** Capture compound mass spectrometry--a powerful tool to identify novel c-di-GMP effector proteins. *J Vis Exp*, e51404.

**Lazzaroni, J. C., Germon, P., Ray, M. C. & Vianney, A. (1999).** The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett* **177**, 191-197.

**Lee, E. R., Baker, J. L., Weinberg, Z., Sudarsan, N. & Breaker, R. R. (2010).** An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**, 845-848.

**Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007).** A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**, 1474-1484.

**Leigh, J. A. & Walker, G. C. (1994).** Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet* **10**, 63-67.

**Leonard, L. T. (1943).** A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of *Rhizobia*. *JBacteriol* **45**, 523-527.

**Levi, A. & Jenal, U. (2006).** Holdfast formation in motile swarmer cells optimizes surface attachment during *Caulobacter crescentus* development. *J Bacteriol* **188**, 5315-5318.

**Leyva, A., Palacios, J. M., Mozo, T. & Ruiz-Argueso, T. (1987).** Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol* **169**, 4929-4934.

- Li, C., Ichikawa, J. K., Ravetto, J. J., Kuo, H. C., Fu, J. C. & Clarke, S. (1994).** A new gene involved in stationary-phase survival located at 59 minutes on the *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol* **176**, 6015-6022.
- Li, T. N., Chin, K. H., Fung, K. M., Yang, M. T., Wang, A. H. & Chou, S. H. (2011).** A novel tetrameric PilZ domain structure from *xanthomonads*. *PLoS One* **6**, e22036.
- Liang, Z. X. (2015).** The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat Prod Rep* **32**, 663-683.
- Lim, B., Beyhan, S., Meir, J. & Yildiz, F. H. (2006).** Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol* **60**, 331-348.
- Lovering, A. L., Capeness, M. J., Lambert, C., Hobley, L. & 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**, e00163-11.
- Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *J Bacteriol* **189**, 8353-8356.
- Mann, E. E. & Wozniak, D. J. (2012).** *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 893-916.
- Marczak, M., Dzwierzynska, M. & Skorupska, A. (2013).** Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Biol Chem* **394**, 541-559.
- Martínez-Gil, M., Ramos-González, M. I. & Espinosa-Urgel, M. (2014).** Role of c-di-GMP and the Gac System in the Transcriptional Control of the Genes Coding for the *Pseudomonas putida* Adhesins LapA and LapF. *J Bacteriol*.
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J. J., Ramos, J. L. & Ramos-González, M. I. (2007).** Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* **8**, R179.
- Matilla, M. A., Travieso, M. L., Ramos, J. L. & Ramos-González, 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.
- Matsuyama, B. Y., Krasteva, P. V., Baraquet, C., Harwood, C. S., Sondermann, H. & Navarro, M. V. (2016).** Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E209-218.

- Matthysse, A. G. (1983).** Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J Bacteriol* **154**, 906-915.
- Matthysse, A. G., White, S. & Lightfoot, R. (1995).** Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **177**, 1069-1075.
- Matthysse, A. G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B. E., Fuqua, C. & White, A. R. (2005).** The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1002-1010.
- Matthysse, A. G. (2014).** Attachment of *Agrobacterium* to plant surfaces. *Front Plant Sci* **5**, 252.
- McIntosh, M., Stone, B. A. & Stanisich, V. A. (2005).** Curdlan and other bacterial (1->3)-beta-D-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 163-173.
- McKenzie, G. J. & Craig, N. L. (2006).** Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event. *BMC Microbiol* **6**, 39.
- Mega, R., Kondo, N., Nakagawa, N., Kuramitsu, S. & Masui, R. (2009).** Two dNTP triphosphohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa* possess diverse substrate specificities. *Febs j* **276**, 3211-3221.
- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007).** The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65**, 876-895.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. & Miller, S. I. (2011).** The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* **13**, 1122-1129.
- Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).** Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289-298.
- Mochalkin, I., Lightle, S., Zhu, Y., Ohren, J. F., Spessard, C., Chirgadze, N. Y., Banotai, C., Melnick, M. & McDowell, L. (2007).** Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial target N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase (GlmU). *Protein Sci* **16**, 2657-2666.
- Mole, B. M., Baltrus, D. A., Dangl, J. L. & Grant, S. R. (2007).** Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **15**, 363-371.

- Moll, D., Prinz, A., Gesellchen, F., Drewianka, S., Zimmermann, B. & Herberg, F. W. (2006a).** Biomolecular interaction analysis in functional proteomics. *J Neural Transm* **113**, 1015-1032.
- Moll, D., Zimmermann, B., Gesellchen, F. & Herberg, F. W. (2006b).** Current Developments for the In Vitro Characterization of Protein Interactions. In *Proteomics in Drug Research*, pp. 159-172: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Monahan-Giovanelli, H., Pinedo, C. A. & Gage, D. J. (2006).** Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* **140**, 661-670.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Gross, R. H. & 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.
- Mongiardini, E. J., Ausmees, N., Perez-Gimenez, J., Julia Althabegoiti, M., Ignacio Quelas, J., Lopez-Garcia, S. L. & Lodeiro, A. R. (2008).** The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiol Ecol* **65**, 279-288.
- Monteiro, C., Saxena, I., Wang, X. & other authors (2009).** Characterization of cellulose production in *Escherichia coli* Nissle 1917 and its biological consequences. *Environ. Microbiol* **11**, 1105-1116.
- Morgan, J. L., Strumillo, J. & Zimmer, J. (2013).** Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* **493**, 181-186.
- Morgan, J. L., McNamara, J. T. & Zimmer, J. (2014).** Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol.* **21**, 489-96.
- Napoli, C., Dazzo, F. & Hubbell, D. (1975).** Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Appl. Microbiol.* **30**, 123-131.
- 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**, 4874-8.
- Neunuebel, M. R. & Golden, J. W. (2008).** The *Anabaena* sp. strain PCC 7120 gene all2874 encodes a diguanylate cyclase and is required for normal heterocyst development under high-light growth conditions. *J Bacteriol* **190**, 6829-6836.
- Newell, P. D., Monds, R. D. & 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.

**Nogales, J., Bernabeu-Roda, L., Cuellar, V. & Soto, M. J. (2012).** ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **194**, 2027-2035.

**O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B. & Kolter, R. (1999).** Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**, 91-109.

**Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A. & other authors (2016).** *Rhizobium*-legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. *Isme J.* **10**, 64-74.

**Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2008).** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.

**Olivares, J., Bedmar, E. J. & Sanjuán, J. (2013).** Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 486-494.

**Olsen, L. R. & Roderick, S. L. (2001).** Structure of the *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. *Biochemistry* **40**, 1913-1921.

**Olsen, L. R., Vetting, M. W. & Roderick, S. L. (2007).** Structure of the *E. coli* bifunctional GlmU acetyltransferase active site with substrates and products. *Protein Sci* **16**, 1230-1235.

**Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Melida, H., Mazur, O., Bulone, V. & Zimmer, J. (2013).** BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**, 17856-61.

**Pagano, B., Mattia, C. A. & Giancola, C. (2009).** Applications of isothermal titration calorimetry in biophysical studies of G-quadruplexes. *Int J Mol Sci* **10**, 2935-2957.

**Palm, G. J., Billy, E., Filipowicz, W. & Wlodawer, A. (2000).** Crystal structure of RNA 3'-terminal phosphate cyclase, a ubiquitous enzyme with unusual topology. *Structure* **8**, 13-23.

**Pappachan, A., Savithri, H. S. & Murthy, M. R. (2008).** Structural and functional studies on a mesophilic stationary phase survival protein (Sur E) from *Salmonella typhimurium*. *Febs j* **275**, 5855-5864.

**Patin, D., Bayliss, M., Mengin-Lecreulx, D., Oyston, P. & Blanot, D. (2015).** Purification and biochemical characterisation of GlmU from *Yersinia pestis*. *Arch Microbiol* **197**, 371-378.

**Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F. & 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.

- Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. & Jenal, U. (2004).** Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* **18**, 715-727.
- Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. & Jenal, U. (2007).** Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J. Biol. Chem* **282**, 29170-29177.
- Pellock, B. J., Teplitski, M., Boinay, R. P., Bauer, W. D. & Walker, G. C. (2002).** A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 5067-5076.
- Perego, M. & 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. & 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., Sanjuán, J. & 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., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. T. & Sanjuán, J. (2014).** Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* **9**, e91645.
- Pérez-Mendoza, D., Rodríguez-Carvajal, M. A., Romero-Jiménez, L., Farias Gde, A., Lloret, J., Gallegos, M. T. & Sanjuán, J. (2015).** Novel mixed-linkage beta-glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E757-765.
- Pérez-Mendoza, D. & Sanjuán, J. (2016).** Exploiting the commons: cyclic diguanylate regulation of bacterial exopolysaccharide production. *Curr Opin Microbiol* **30**, 36-43.
- Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. J. (2000).** Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. & Hengge, R. (2008).** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434-2446.
- Peters, J. E. & Craig, N. L. (2001).** Tn7: smarter than we thought. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* **2**, 806-814.

**Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.

**Pimenta, A. L., Racher, K., Jamieson, L., Blight, M. A. & Holland, I. B. (2005).** Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J Bacteriol* **187**, 7471-7480.

**Pompeo, F., Bourne, Y., van Heijenoort, J., Fassy, F. & Mengin-Lecreulx, D. (2001).** Dissection of the bifunctional *Escherichia coli* N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase enzyme into autonomously functional domains and evidence that trimerization is absolutely required for glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity and cell growth. *J Biol Chem* **276**, 3833-3839.

**Potrykus, K. & Cashel, M. (2008).** (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**, 35-51.

**Prada-Ramírez, H. A. (2014).** Papel del segundo mensajero c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Tesis doctoral: Universidad de Granada.

**Prada-Ramírez, H. A., Pérez-Mendoza, D., Felipe, A., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., Sanjuán, J. & Gallegos, M. T. (2015).** AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Microbiol*. **99**, 960-77.

**Pultz, I. S., Christen, M., Kulasekara, H. D., Kennard, A., Kulasekara, B. & Miller, S. I. (2012).** The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* **86**, 1424-1440.

**Qi, Y., Chuah, M. L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K. & 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.

**Quinto, C., De, L., V, Flores, M. & other authors (1985).** Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1170-1174.

**Ramelot, T. A., Yee, A., Cort, J. R., Semesi, A., Arrowsmith, C. H. & 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.

**Rao, F., Yang, Y., Qi, 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.

**Raymond, S., Tocilj, A., Ajamian, E., Li, Y., Hung, M. N., Matte, A. & Cygler, M. (2005).** Crystal structure of ureidoglycolate hydrolase (AllA) from *Escherichia coli* O157:H7. *Proteins* **61**, 454-459.

- Redondo, F. J., de la Pena, T. C., Morcillo, C. N., Lucas, M. M. & Pueyo, J. J. (2009).** Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. *Plant Physiol* **149**, 1166-1178.
- Reinders, A., Hee, C. S., Ozaki, S., Mazur, A., Boehm, A., Schirmer, T. & Jenal, U. (2015).** Expression and Genetic Activation of c-di-GMP specific Phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*.
- Rigaud, J. & Puppo, A. (1975).** Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**, 223-228.
- Rinaudi, L. V. & González, J. E. (2009).** The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J. Bacteriol* **191**, 7216-7224.
- Robertsen, B. K., Aman, P., Darvill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1981).** The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol* **67**, 389-400.
- Rodionov, D. A. & Gelfand, M. S. (2005).** Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* **21**, 385-389.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S. & Ruiz-Sainz, J. E. (2007).** Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* **272**, 127-136.
- Roelofs, K. G., Wang, J., Sintim, H. O. & 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**, 15528-33.
- Romero, D. & Brom, S. (2004).** The symbiotic plasmid of the *Rhizobiaceae*. In *Plasmid biology*, pp. pp. 271-290. Edited by B. E. Funnell, Phillips, G.J. . Washington: ASM Press.
- Romling, U. & Balsalobre, C. (2012).** Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* **272**, 541-561.
- Römmling, U. (2002).** Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol* **153**, 205-212.
- Römmling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol* **57**, 629-639.
- Römmling, U., Galperin, M. Y. & Gomelsky, M. (2013).** Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol.Mol.Biol.Rev* **77**, 1-52.

**Römling, U. & Galperin, M. Y. (2015).** Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol.*

**Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y. & other authors (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279-281.

**Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. (1991).** Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev* **55**, 35-58.

**Rotem, O., Nesper, J., Borovok, I. & other authors (2016).** An Extended Cyclic Di-GMP Network in the Predatory Bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **198**, 127-137.

**Ruffing, A. M. & Chen, R. R. (2012).** Transcriptome profiling of a curdlan-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis. *Microb Cell Fact* **11**, 1-13.

**Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J. A. & Zorreguieta, A. (2006).** Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **188**, 4474-4486.

**Ryan, R. P., Fouhy, Y., Lucey, J. F., Jiang, B. L., He, Y. Q., Feng, J. X., Tang, J. L. & 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., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2010).** 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., McCarthy, Y., Kiely, P. A., O'Connor, R., Farah, C. S., Armitage, J. P. & Dow, J. M. (2012a).** Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **86**, 557-567.

**Ryan, R. P., Tolker-Nielsen, T. & Dow, J. M. (2012b).** When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. *Trends Microbiol* **20**, 235-242.

**Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U. & 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.

**Salazar, E., Diaz-Mejia, J. J., Moreno-Hagelsieb, G., Martinez-Batallar, G., Mora, Y., Mora, J. & Encarnación, S. (2010).** Characterization of the NifA-RpoN regulon in *Rhizobium etli* in free life and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4510-4520.

---

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press New York.

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.

**Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaefer, V., Hilker, R., Sogaard-Andersen, L. & Becker, A. (2016).** Cyclic Di-GMP Regulates Multiple Cellular Functions in the Symbiotic Alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **198**, 521-535.

**Schirmer, T. & Jenal, U. (2009).** Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat.Rev.Microbiol.* **7**, 724-735.

**Schmid, J., Sieber, V. & Rehm, B. (2015).** Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol* **6**, 496.

**Scholten, A., Poh, M. K., van Veen, T. A., van Breukelen, B., Vos, M. A. & Heck, A. J. (2006).** Analysis of the cGMP/cAMP interactome using a chemical proteomics approach in mammalian heart tissue validates sphingosine kinase type 1-interacting protein as a genuine and highly abundant AKAP. *J Proteome Res* **5**, 1435-1447.

**Schultze, M. & Kondorosi, A. (1998).** Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* **32**, 33-57.

**Seshasayee, A. S., Fraser, G. M. & 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.

**Seto, D., Bhatnagar, S. K. & Bessman, M. J. (1988).** The purification and properties of deoxyguanosine triphosphate triphosphohydrolase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**, 1494-1499.

**Shanahan, C. A. & Strobel, S. A. (2012).** The bacterial second messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. *Org Biomol Chem* **10**, 9113-9129.

**Shikuma, N. J., Fong, J. C. & Yildiz, F. H. (2012).** Correction: Cellular Levels and Binding of c-di-GMP Control Subcellular Localization and Activity of the *Vibrio cholerae* Transcriptional Regulator VpsT. *PLoS Pathog* **8**.

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

**Simon, R., Prierer, U. & Puhler, A. (1983).** A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* **1**, 784-791.

**Singh, D., Gawel, D., Itsko, M., Hochkoeppler, A., Krahn, J. M., London, R. E. & Schaaper, R. M. (2015).** Structure of *Escherichia coli* dGTP triphosphohydrolase: a hexameric enzyme with DNA effector molecules. *J Biol Chem* **290**, 10418-10429.

**Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. & Krol, J. (2006).** Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact* **5**, 7.

**Smit, G., Kijne, J. W. & Lugtenberg, B. J. (1987).** Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol* **169**, 4294-4301.

**Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. & Kijne, J. W. (1992).** Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol* **6**, 2897-2903.

**Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C. & Lasa, I. (2002).** Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol* **43**, 793-808.

**Soto, M. J., Fernández-Pascual, M., Sanjuán, J. & Olivares, J. (2002).** A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol. Microbiol* **43**, 371-382.

**Soto, M. J., Domínguez-Ferrerías, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J. & Olivares, J. (2009).** Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**, 381-388.

**Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B. & Schmitt, R. (2000).** VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J Bacteriol* **182**, 782-788.

**Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.

**Spiers, A. J., Kahn, S. G., Bohannon, J., Travisano, M. & 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.

**Srivastava, D. & Waters, C. M. (2012).** A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic Di-GMP. *J Bacteriol* **194**, 4485-4493.

**Steiner, S., Lori, C., Boehm, A. & Jenal, U. (2012).** Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *EMBO J.* **32**, 354-368.

- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H. & Breaker, R. R. (2008).** Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**, 411-413.
- Tagliabue, L., Antoniani, D., Maciag, A., Bocci, P., Raffaelli, N. & 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.
- Tal, R., Wong, H. C., Calhoon, R. & other authors (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.
- Tamayo, R., Pratt, J. T. & Camilli, A. (2007).** Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 131-148.
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V. (2000).** The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**, 33-36.
- Teather, R. M. & 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.
- Timmers, A. C., Soupene, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P. & Truchet, G. (2000).** Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1204-1213.
- Toh, E., Kurtz, H. D., Jr. & Brun, Y. V. (2008).** Characterization of the *Caulobacter crescentus* holdfast polysaccharide biosynthesis pathway reveals significant redundancy in the initiating glycosyltransferase and polymerase steps. *J Bacteriol* **190**, 7219-7231.
- Trampari, E., Stevenson, C. E., Little, R. H., Wilhelm, T., Lawson, D. M. & Malone, J. G. (2015).** Bacterial Rotary Export ATPases Are Allosterically Regulated by the Nucleotide Second Messenger Cyclic-di-GMP. *J Biol Chem* **290**, 24470-24483.
- Trempe, J. F., Shenker, S., Kozlov, G. & Gehring, K. (2011).** Self-association studies of the bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **20**, 745-752.
- Tschowri, N., Schumacher, M. A., Schlimpert, S., Chinnam, N. B., Findlay, K. C., Brennan, R. G. & Buttner, M. J. (2014).** Tetrameric c-di-GMP Mediates Effective Transcription Factor Dimerization to Control *Streptomyces* Development. *Cell* **158**, 1136-1147.

**Tuckerman, J. R., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M. A. (2011).** Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol* **407**, 633-639.

**Vasse, J., de Billy, F., Camut, S. & Truchet, G. (1990).** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**, 4295-4306.

**Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. & Filloux, A. (2005).** The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* **151**, 985-997.

**Viprey, V., Perret, X. & Broughton, W. J. (2000).** Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell Biochem* **33**, 437-456.

**Vithani, N., Bais, V. & Prakash, B. (2014).** GlnU (N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase) bound to three magnesium ions and ATP at the active site. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **70**, 703-708.

**Vorontsov, II, Minasov, G., Kiryukhina, O., Brunzelle, J. S., Shuvalova, L. & Anderson, W. F. (2011).** Characterization of the deoxynucleotide triphosphate triphosphohydrolase (dNTPase) activity of the EF1143 protein from *Enterococcus faecalis* and crystal structure of the activator-substrate complex. *J Biol Chem* **286**, 33158-33166.

**Waddell, C. S. & Craig, N. L. (1989).** Tn7 transposition: recognition of the *attTn7* target sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3958-3962.

**Walburger, A., Lazdunski, C. & Corda, Y. (2002).** The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB. *Mol Microbiol* **44**, 695-708.

**Wang, L. X., Wang, Y., Pellock, B. & Walker, G. C. (1999).** Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **181**, 6788-6796.

**Wang, X., Preston, J. F., 3rd & Romeo, T. (2004).** The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**, 2724-2734.

**Wang, Y., Xu, J., Chen, A., Wang, Y., Zhu, J., Yu, G., Xu, L. & Luo, L. (2010).** GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **42**, 410-417.

**Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U. & Schirmer, T. (2007).** Structure of BeF3- -modified response regulator PleD: implications for

diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15**, 915-927.

**Whiteley, C. G. & Lee, D. (2014).** Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnol Adv.* **33**, 124-41.

**Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R. & Howell, P. L. (2012).** Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **287**, 23582-23593.

**Whitney, J. C. & Howell, P. L. (2012).** Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.*

**Wilksch, J. J., Yang, J., Clements, A. & other authors (2011).** MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* **7**, e1002204.

**Williams, A., Wilkinson, A., Krehenbrink, M., Russo, D. M., Zorreguieta, A. & Downie, J. A. (2008).** Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *J. Bacteriol.* **190**, 4706-4715.

**Wolfe, A. J. & Visick, K. L. (2008).** Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* **190**, 463-475.

**Wolfe, A. J. & Visick, K. L. (2010).** The Second Messenger Cyclic Di-GMP: Washington, DC, American Society of Microbiology.

**Xu, J., Kim, J., Danhorn, T., Merritt, P. M. & Fuqua, C. (2012).** Phosphorus limitation increases attachment in *Agrobacterium tumefaciens* and reveals a conditional functional redundancy in adhesin biosynthesis. *Res Microbiol* **163**, 674-684.

**Xu, J., Kim, J., Koestler, B. J., Choi, J. H., Waters, C. M. & 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.

**Yan, H. & Chen, W. (2010).** 3',5'-Cyclic diguanylic acid: a small nucleotide that makes big impacts. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2914-2924.

**Yang, C., Signer, E. R. & Hirsch, A. M. (1992).** Nodules Initiated by *Rhizobium meliloti* Exopolysaccharide Mutants Lack a Discrete, Persistent Nodule Meristem. *Plant Physiol* **98**, 143-151.

**Young, J. P., Crossman, L. C., Johnston, A. W. & other authors (2006).** The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol* **7**, R34.

- Yousef, F. & Espinosa-Urgel, M. (2007).** In silico analysis of large microbial surface proteins. *Res Microbiol* **158**, 545-550.
- Yurgel, S. N., Rice, J., Domreis, E. & other authors (2014).** *Sinorhizobium meliloti* flavin secretion and bacteria-host interaction: role of the bifunctional RibBA protein. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 437-445.
- Zamorano-Sánchez, D., Fong, J. C., Kilic, S., Erill, I. & Yildiz, F. H. (2015).** Identification and characterization of VpsR and VpsT binding sites in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **197**, 1221-1235.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. & Steward, G. F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5**, 539-554.
- Zhang, R. & Edgar, K. J. (2014).** Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. *Biomacromolecules* **15**, 1079-1096.
- Zhang, R. G., Skarina, T., Katz, J. E. & other authors (2001).** Structure of *Thermotoga maritima* stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase. *Structure* **9**, 1095-1106.
- Zhang, Z., Bulloch, E. M., Bunker, R. D., Baker, E. N. & Squire, C. J. (2009).** Structure and function of GlmU from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 275-283.
- Zheng, Z., Fuqua, C. & Chen, L. (2012).** The *quorum sensing* transcriptional regulator TraR has separate binding sites for DNA and the anti-activator. *Biochem Biophys Res Commun* **418**, 396-401.
- Zogaj, X., Nimitz, M., Rohde, M., Bokranz, W. & 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., García, B., Latasa, C., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Lasa, I. & Solano, C. (2013).** Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella motility* through YcgR and cellulose. *J. Bacteriol* **195**, 417-428.