



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Biomedicina

Eje terminal: Microbiología

Laboratorio de Genética Molecular Microbiana

TESIS

“Caracterización de la cinasa histidínica RetS en *Azotobacter vinelandii*
(AEIV)”

Para obtener el título de
Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Eduardo Minto González

Directora de tesis:

D.C. Liliana López Pliego

Asesores de tesis:

D.C. Miguel Castañeda Lucio

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Puebla

Junio, 2021

Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido influida por una gran cantidad de personas que de alguna manera permitieron su realización. Por ello quiero hacer una mención a algunos individuos que de alguna manera influyeron en este trabajo. Antes que nada, gracias a mi familia, que siempre me apoyaron en todo momento, aun cuando estaba teniendo un colapso mental. Madre, te agradezco por todo. Gracias por siempre darme la libertad para escoger mi camino, apoyarme y siempre estar ahí cuando lo requería. A mis hermanas, Sarahí y Charo, y a mi hermano, Andrés, les agradezco cada muestra de apoyo e interés. Sé que, aunque tomemos rumbos distintos siempre estarán ahí cuando lo requiera y, de igual manera, yo para ustedes. Por último, gracias a mi Padre por las bases que me diste, sé que nuestra despedida fue repentina, pero te agradezco por todo.

A mis compañeros del laboratorio y al Dr. Miguel gracias por su apoyo y disponibilidad a lo largo de mi estadía en el laboratorio. Les agradezco haberme incorporado al grupo, consejos y apoyo. De igual manera, muchas gracias a la Dra. Liliana por sus consejos, por sus enseñanzas y disponibilidad para resolver cada duda que me surgiera. Sé que pudieron haber sido muchos cuestionamientos y uno que otro comentario pesimista de mi parte, pero siempre me dio la confianza para poder hacerlo por mi y la confiar en mis capacidades. No queda más que agradecer a todas las personas que de alguna manera contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	8
<i>1.- Introducción</i>	10
1.1 Antecedentes generales.	10
1.1.1 Sistemas de doble componente (TCSs).	10
1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : generalidades y el TCS GacS/GacA.....	14
1.1.3 Las cinasas histidínicas híbridas LadS y RetS en <i>P. aeruginosa</i>	18
1.1.4 Vía alternativa Hpt en <i>P. aeruginosa</i>	22
1.1.5 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	24
1.1.6 Regulación de los metabolitos de interés industrial por la cascada Gac/Rsm.....	26
1.2 Antecedentes específicos.....	34
1.2.1 RetS y LadS en <i>Azotobacter vinelandii</i>	34
1.2.2 Mutante AEIV <i>retS</i> ::gm en <i>Azotobacter vinelandii</i>	35
1.2.3 Generación de una nueva mutante <i>retS</i>	36
<i>2.- Justificación</i>	38
<i>3.- Planteamiento del problema</i>	38
<i>4.- Hipótesis Científica</i>	39
<i>5.- Objetivos</i>	39
5.1 Objetivo General.	39
5.2 Objetivos Específicos.....	39
<i>6.- Resultados</i>	40
6.1.- Complementar a las mutantes AEIV <i>retS</i> ::km	40
6.1.1.- Complementación en <i>trans</i> -.	43
6.1.2.- Complementación en <i>cis</i> -.	46
6.1.3.- Cuantificación de alginatos de la cepa AEIV <i>retS</i> ::km NP complementada en <i>trans</i>	49
6.1.4.- Ensayos de síntesis de alquilresorcinoles de las complementadas.	50
6.2.- Sobreexpresar al gen <i>retS</i> en el fondo de la cepa silvestre AEIV.....	52
6.3.- Determinar el efecto de la mutación, por la inserción del casete de Kanamicina, en las mutantes AEIV <i>retS</i> sobre los fenotipos alginatos y alquilresorcinoles.....	54
<i>7.- Discusión</i>	57
7.1.- Complementación de las mutantes AEIV <i>retS</i> ::km.....	57
7.2.- Sobreexpresión del gen <i>retS</i> en el fondo de la cepa silvestre AEIV.....	59
7.3.- Determinación del efecto de la mutación, por la inserción del casete de Kanamicina, en las mutantes AEIV <i>retS</i> sobre los fenotipos alginatos y alquilresorcinoles.....	60
<i>8.- Conclusiones</i>	68

9.- <i>Perspectivas</i>	68
10.- <i>Material y Métodos</i>	69
10.2.- Oligonucleótidos empleados.	70
10.3.- Cepas empleadas.	70
10.4.- Medios de cultivo.....	72
10.5.- Metodologías.....	74
11.- <i>Anexos</i>	81
12.- <i>Bibliografía</i>	81

ÍNDICE DE TABLA DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de los motivos requeridos para la unión de ATP en las cinasas (Dutta & Inouye, 2000).	11
Fig. 2. Clasificación de las cinasas histidínicas de acuerdo con su dominio citoplasmático. Modificado de (Bhate et. al, 2015).	13
Fig. 3. Representación gráfica de unas redes multicinasa (MKN). d) Cinasas histidínicas híbridas que convergen en la fosforilación de un Hpt, el cual transfiere el fosforilo a un RR. e) Ejemplificación de redes multicinasa donde las HKs integrantes de la vía funcionan como activadores y represoras de la transferencia del grupo fosforilo a un Hpt (Francis & Porter, 2019).	14
Fig. 4. Esquema del funcionamiento de Sistema. A.) Cuando RsmA se une a su mRNA blanco, evita su traducción al unirse cerca del sitio de unión al ribosoma (RBS). Al mismo tiempo, lo desestabiliza y promueve su degradación por una RNAsaE. B.) Cuando los pequeños RNAs no codificantes (snc-RNAs) del sistema Rsm son expresados adoptan una estructura secundaria, donde en sus asas secuestran a RsmA. A partir de ello, el mRNA blanco de RsmA se puede traducir. C.) Estructura secundaria de tallo y asa que se forma de los transcritos de los snc-RNAs. En sus asas se encuentra resaltado la secuencia reconocida por RsmA.	17
Fig. 5. Organización de los dominios de LadS y RetS (Ventre et. al., 2006).	20
Fig. 6. Cascada Gac/A-Rsm en <i>P. aeruginosa</i> y sus blancos de regulación. Adaptado de (Francis et. al, 2018).	21
Fig. 7. Esquema de los mecanismos propuestos que ejerce RetS sobre GacS (Francis et. al., 2018)	22
Fig. 8. Representación de los integrantes de la cascada Gac y la rama HptB (Francis & Porter, 2019). ..	24
Fig. 9. Microscopía electrónica de transmisión del quiste. EX: exina. I: intina	25
Fig. 10. Componentes estructurales de los alginatos (Hay et. al, 2013).	27
Fig. 11. Arreglo genético de los genes involucrados en la síntesis de alginatos en <i>A. vinelandii</i> (Pacheco-Leyva, Pezoa & Díaz-Barrera, 2016).	28
Fig. 12. Vía de síntesis de alginatos en <i>A. vinelandii</i> (Pacheco-Leyva, Pezoa & Díaz-Barrera, 2016).	29

Fig. 13. A.) Arreglo del operón <i>ars</i> . B.) Esquema de la vía de síntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas en <i>A. vinelandii</i> . C.) Ilustración de los dominios funcionales sintasas de ácidos grasos, <i>ArsA</i> y <i>ArsD</i> (Mander & Liu, 2010).	32
Fig. 14. Representación de las vías involucradas en la regulación del operón <i>arsABCD</i> , requerido para la síntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas. Adaptado de (Francis & Porter, 2019)	33
Fig. 15. Sistema de doble híbrido. En el esquema izquierdo se ejemplifica un tipo de interacción negativa, mientras que el derecho una positiva. En el centro de la figura es una placa de agar McConkey. Donde se muestra a las distintas cepas que contenían en doble híbrido (Sánchez Cuapio, 2012).	34
Fig. 16. Gráfica de cuantificación de alginatos de la mutante <i>AEIVretS::gm</i> (Reyes Nicolau, 2018).	35
Fig. 17. Gráfica de cuantificación de actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de los <i>snc</i> -RNAs Z1, Z2, Z6 y Y (Reyes Nicolau, 2018).	36
Fig. 18. Gráfica de cuantificación de alginatos de la cepa silvestre (WT), la mutante <i>AEIVgacA::gm</i> , <i>AEIVretS::km</i> y <i>AEIVretS::km NP</i> (Reyes Nicolau, 2018).	37
Fig. 19. Gráfica de cuantificación de las fusiones transcripcionales de los <i>snc</i> -RNAs del sistema <i>Rsm</i> . Donde se Muestran a las cepas con las fusiones transcripcionales Z1, Z2, Z6 y Y, de la WT y la mutante <i>AEIVretS::km NP</i> (Nicolau, 2018).	38
Fig. 20. A.) Representación gráfica de los dos tipos de complementaciones B.) Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de la PCR de la amplificación del gen <i>retS</i> con su región reguladora. Marcador de peso molecular de 1 Kb.	41
Fig. 21. Diferentes electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de restricciones para confirmar a la construcción <i>pCR2.1-TOPO-retS</i> . Marcador de peso molecular de 1 Kb.	42
Fig. 22. Esquema de los tamaños esperados al tratarse al vector <i>pCR2.1-TOPO-retS</i> con distintas enzimas de restricción.	42
Fig. 23. Esquema del marco de trabajo para generar al vector <i>pBBR1MCS-5-retS</i>	43
Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de las restricciones realizadas para confirmar el vector <i>pBBR1MCS-5-retS</i> . Marcador de peso molecular de 1 Kb.	44

Fig. 25. Mapa del vector pBBR1MCS-5- <i>retS</i> y los tamaños esperados al tratarse con las enzimas de restricción.....	44
Fig. 26. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de la PCR para confirmar la presencia del alelo silvestre del vector pBBR1MCS-5- <i>retS</i> en las transconjugantes a ser A.) la mutante AEIV <i>retS</i> ::km Polar y B.) No Polar complementadas en <i>trans</i> - Marcador de peso molecular de 1 Kb.....	45
Fig. 27. Mapa de trabajo de cómo se generó al vector pUMA-tc- <i>retS</i>	46
Fig. 28. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr A.) de la restricción realizada con <i>EcoRI</i> y B.) la restricción con <i>SmaI</i> para confirmar a la construcción pUMA-tc- <i>retS</i> . Marcador de peso molecular de 1 Kb.....	47
Fig. 29. Esquema de la construcción pUMA-tc- <i>retS</i> y los tamaños esperados al realizarse ensayos de restricción con distintas enzimas.	48
Fig. 30. Electroforesis realizada en gel de agarosa, revelada con EtBr de A.) de la PCR para confirmar a la cepa AEIVpUMA-tc- <i>retS</i> y B.) de las PCR para confirmar a las mutantes AEIV <i>retS</i> ::km P y NP complementadas en <i>cis</i> -. Marcador de peso molecular de 1 Kb.	49
Fig. 31. Gráfica de cuantificación de alginatos de la complementada AEIV <i>retS</i> ::km NP complementada en <i>trans</i> -.	50
Fig. 32. Ensayos cualitativos de síntesis de alquilresorcinoles de: A.) de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km P complementada en <i>trans</i> -, B.) de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km NP complementada en <i>trans</i> -, C.) la mutante AEIV <i>retS</i> ::km NP complementada en <i>cis</i> - y D.) de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km P complementada en <i>cis</i> -. .	52
Fig. 33. Electroforesis en gel de agarosa, revelados con EtBr, de A.) las candidatas a ser la WT donde se sobrepresó a la WT (AEIV <i>retS</i>). Marcador de peso molecular de 1 Kb.....	53
Fig. 34. A.) Ensayo cualitativo de síntesis de alquilresorcinoles de las mutantes AEIV <i>retS</i> ::km P y NP. B.) Tubos de ensayo de cultivos centrifugados de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km NP en ambos estadios.	55
Fig. 35. Gráfica de cuantificación de alginatos de las mutantes AEIV <i>retS</i> ::km NP en ambos estadios (blanco/mucoide y café/no mucoide).	56

Fig. 36. Ensayos cualitativos de síntesis de alquilresorcinoles de las mutantes AEIV*retS*::km. En la placa A.) se encuentra el ensayo de la mutante AEIV*retS*::km NP mucoide/blanco y no mucoide/café. Mientras que en la placa B.) la mutante AEIV*retS*::km P en sus estadios mucoide/blanco y no mucoide/café.57

Fig. 37. Esquema de los mecanismos genéticos involucrados en la variación de fase. A.) Emparejamiento erróneo de hebras deslizadas. B.) Recombinación homóloga. C.) Recombinación conservada de DNA sitio específico. D. Descripción de cómo se lleva a cabo el emparejamiento erróneo de hebras deslizadas, durante la replicación. Modificado de (Hansson et. al, 2018; Phillips, Tram, Seib & Atack, 2019).....62

Fig. 38. Alineamientos de los dominios transmisores de las HKs RetS de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa* y *P. protegens* Pf-5; y la de GacS de *A. vinelandii*.81

Resumen

Las cinasas histidínicas permiten una forma de detección de estímulos del ambiente y promover un cambio en distintos niveles de regulación. Estas se encuentran distribuidas en los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya. Gran parte de estas proteínas se encuentran formando parte de sistemas de doble componente, donde el otro integrante del sistema es la proteína efectora, llamada regulador de respuesta. Las cinasas histidínicas que no forman parte de estos sistemas se les denominan huérfanas. Este término se les atribuye a aquellas, cuyo gen, no está adyacente o en la vecindad de un gen que codifique a un regulador de respuesta.

En *Azotobacter vinelandii* la síntesis de alginatos, alquilresorcinoles y alquilpironas se encuentra regulado por la cascada Gac/Rsm. La cual está constituida por el sistema de doble componente GacS/GacA y el sistema de regulación post-transcripcional Rsm. La conservación de estos sistemas está ampliamente distribuida en gamma proteobacterias. En *Pseudomonas aeruginosa* también se encuentra esta cascada, donde los niveles de la proteína efectora, GacA activa, son regulados por dos cinasas histidínicas huérfanas. Estas son LadS y RetS, que actúan como activador y represor de la cinasa histidínica GacS, respectivamente. Cuantificaciones previas de los blancos directos e indirectos del sistema de doble componente indican que LadS actúa como un represor y RetS como un activador de la cascada.

Con el fin de aportar evidencia del papel de regulador positivo de RetS, se decidió complementar a las mutantes AEIV*retS*::km. De las cuales hay dos generadas a partir de la inserción de un casete de resistencia a Kanamicina en dos orientaciones, convergente (no polar) y divergente (polar) a su transcripción con el fin de determinar si no existía un efecto de polaridad sobre los genes río abajo. Dos estrategias fueron establecidas para complementar: la complementación en *cis* y en *trans*. Se obtuvieron las cuatro cepas complementadas, pero las versiones en *trans* no restauraron ninguno de los metabolitos regulados por la cascada. En contraparte, las complementadas en *cis* sí mostraban una restauración de síntesis de los alquilresorcinoles. Ello sugería que RetS fungía como regulador positivo de la cascada en *Azotobacter vinelandii*. Para comprobar la actividad de esta proteína se decidió sobreexpresarla y observar el fenotipo resultante.

Al observar cierta diferencia en la cuantificación de alginatos, entre las mutantes AEIV*retS*::km, siendo residual la síntesis en la mutante Polar, se decidió volver a cuantificar la producción de alginatos. Las cepas fueron sembradas del glicerol, pero éstas mostraban un fenotipo completamente distinto a aquellas que habían recibido un cierto número de pases en placas de medio Burk Sacarosa. Por lo que se exploró si la diferencia fenotípica alteraba a los metabolitos regulados por la vía. Los estadios

observados fueron denominados: blanco/mucoide y café/no mucoide. Al realizarse la cuantificación de alginatos se mostraba que el fenotipo estaba asociado sustancialmente a la síntesis. El estadio blanco/mucoide mostró producción similar a la silvestre. En contraparte, las cepas con fenotipo café/no mucoide no produjeron alginato. También se exploró la síntesis de alquilresorcinoles, otro de los metabolitos regulados por la vía. En los ensayos se observó la misma tendencia, es decir, una mayor síntesis en el estadio blanco/mucoide y ausencia en el fenotipo café/no mucoide.

Una posible explicación al fenotipo variable es a partir de la “variación de fase”, la cual es un fenómeno que genera cambios una misma población clonal que pueden dar lugar a variación fenotípica. Por lo tanto, es una forma de explicar el cambio que se da en las mutantes AEIV*retS*:km. Asimismo, en caso de que ésta sea la razón, existirían fenotipo(s) en la mutantes AEIV*retS*:km cuyo fondo genético sería resultado de más que solo la mutación de *retS*.

1.- Introducción.

1.1 Antecedentes generales.

1.1.1 Sistemas de doble componente (TCSs).

La capacidad de adaptarse a los cambios que se suscitan en el ambiente promoverá la sobrevivencia de algunas especies bacterianas. Para ello, las bacterias han generado sistemas que le permiten detectar aquellos cambios del ambiente para adaptarse y sobrevivir. Una de las vías por la cual son percibidas estas variaciones es a través de los sistemas de doble componente (TCSs) (Parkinson & Kofoid, 1992).

Los TCSs canónicos están constituidos por dos dominios característicos: transmisores y receptores. Éstos funcionan en combinación con una variedad de dominios de entrada y salida. Los cuales pueden ser arreglados en combinaciones diversas, de acuerdo con la construcción de una variedad de circuitos. El circuito más simple contiene dos componentes proteicos: el primero, un sensor que generalmente se encuentra localizado en la membrana citoplasmática, el cual le permite monitorear variables ambientales. El segundo, es un regulador de respuesta citoplasmático, que media la respuesta adaptativa que generalmente conlleva un cambio en la expresión genética (“Two-Component Signaling Systems,” 2005). Hasta ahora, el único mecanismo conocido de comunicación entre transmisores y receptores es a través de la fosforilación. El transmisor tiene la capacidad de autofosforilarse y unir el grupo fosfato proveniente del ATP a un residuo de histidina (His), por lo que se les ha denominado cinasas histidínicas (HK). Mientras que el dominio receptor cataliza la reacción de transferencia del fosfato (Stock, Robinson, & Goudreau, 2000).

Las HKs en general tienen un dominio sensor que se encuentra en el periplasma, una región transmembranal y un dominio citosólico autocinasa (Parkinson & Kofoid, 1992). En intentos por agrupar a estas proteínas se han realizado diversas clasificaciones. Las cuales pueden ser de acuerdo con el dominio sensor, el dominio periplásmico o el dominio citoplasmático.

Una de las clasificaciones más útiles para explicar la naturaleza de la transmisión de la señal, es la realizada por dominio citoplasmático. Las HKs se han clasificado como: clásicas, híbridas y heterodoxas (Jung, Fried, Behr, & Heermann, 2012). Las primeras tienen una estructura prototipo en las que el transmisor posee un dominio de entrada y el dominio transmisor propiamente dicho. Éste último puede dividirse en dos regiones, el DHp/HisKA (de dimerización y fosforilación), conteniendo un residuo His, que va a ser fosforilado; y uno catalítico (CA/HATPasa) que es el responsable de la unión de ATP y de fosforilar la His del DHp. Para ello hay cinco regiones muy conservadas, denominadas como cajas G1, G2, G3, F y N; que son requeridas para la unión del ATP y autofosforilación (Fig. 1). Las HKs híbridas contienen dominios adicionales REC. Mientras que las HKs heterodoxas, aparte del REC poseen un dominio histidín fosfotransferasa (HPT) (Appleby, Parkinson, & Bourret, 1996; R & M, 2000; Wolanin, Thomason, & Stock, 2002).

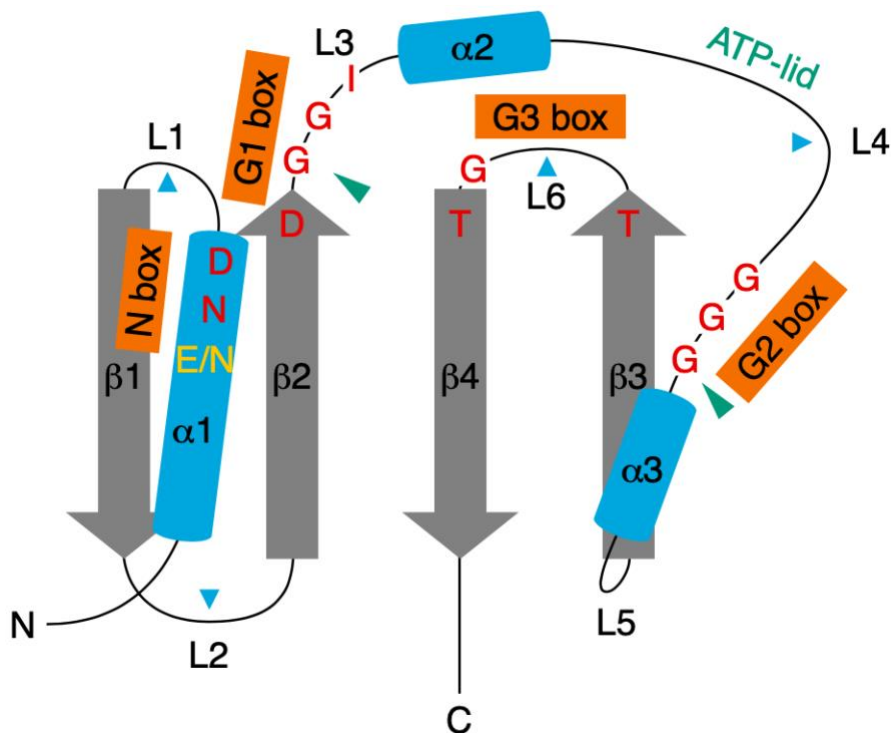


Fig. 1. Esquema de los motivos requeridos para la unión de ATP en las cinasas (Dutta & Inouye, 2000).

El dominio de entrada de las HKs determinará el ligando que es capaz de estimular su autofosforilación. Se han descrito que existen tres clases de dominios sensores: los plegados alfa-beta, los plegados únicamente alfa y los dominios sensores que tienen un plegado similar a proteínas de unión periplásmicas (Cheung & Hendrickson, 2010). Las señales ambientales pueden ser de diversa naturaleza, desde cambios osmóticos, temperatura, pequeñas moléculas e incluso antimicrobianos (Bhate, Molnar, Goulian, & Degrado, 2015).

El dominio receptor (REC) generalmente es parte de una proteína llamada regulador de respuesta (RR). Esta proteína está encargada de recibir la señal de fosforilación para realizar el efecto de respuesta a la condición ambiental. El dominio receptor contiene un residuo de Aspartato (Asp) que recibe el grupo fosforilo de la HK, lo cual estabiliza la conformación activa permitiendo la actividad del dominio efector (Stock et al., 2000). El dominio REC se encuentra unido covalentemente, o no al dominio efector o de salida que enciende la cascada de señalización.

Los RR pueden clasificarse dependiendo de su dominio efector. En el cual el grupo más distribuido poseen de unión a DNA (66%). El segundo de mayor abundancia carece de un dominio efector (23%), pero poseen otros dominios de señalización. Algunos de ellos son los dominios PAS, GAF, HisKA, HTPAsa, entre otros. Mientras que el porcentaje restante es dividido en aquellos que poseen: actividad enzimática (8%), de unión a RNA (1%), de unión a proteínas (1%) y aquellos que no son clasificables en las anteriores (1%) (Gao, Bouillet, & Stock, 2019).

Para poder llevar a cabo la cascada de señalización, el dominio de entrada de la HK requiere unir su ligando que en la mayoría de los casos solamente es uno. Una vez que se estimula al dominio de entrada, se va a promover la formación de un homodímero de la HK y la autofosforilación del residuo conservado de His. Después de ello, éste se transfiere a un residuo de Asp del dominio REC del RR, con lo que se promueve la actividad del dominio de salida (Gao & Stock, 2009). En el caso de las cinasas híbridas y heterodoxas se va a realizar un sistema de fosforrelevo, el cual es un proceso de transferencia del grupo fosforilo entre residuos de His y Asp de los dominios

constituyentes. Lo cual tiene el mismo fin, de fosforilar un residuo Asp del RR y promover la actividad del dominio de salida de la proteína cognada (Appleby et al., 1996). En el caso de las híbridas al carecer de un dominio HPt, requerirán transferir el grupo fosforilo a una histidín fosfotransferasa soluble (Hpt) o a un HPt, de una HK heterodoxa (Fig. 2).

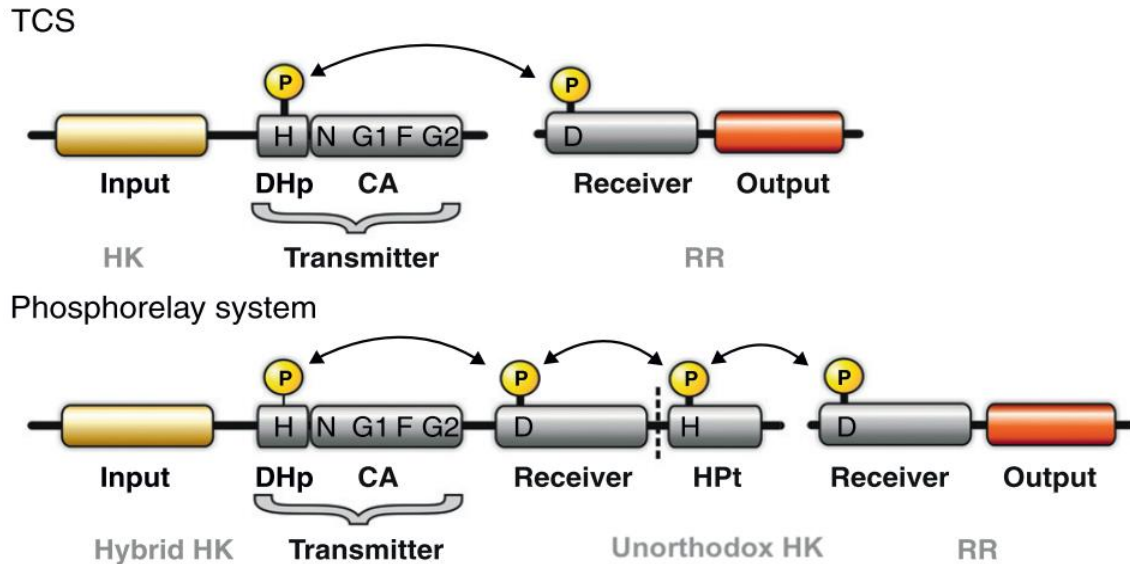


Fig. 2. Clasificación de las cinasas histidínicas de acuerdo con su dominio citoplasmático. Modificado de (Bhate et. al, 2015).

Aunque la respuesta a los estímulos ambientales llevada a cabo por los TCSs canónicos pueden regular una amplia gama de procesos, el ligando que estimula al dominio de entrada de las HKs limita la capacidad de respuesta ante varios estímulos. Por ello, otra forma en la cual las bacterias pueden responder a múltiples estímulos es a través de las redes multicinasa (MKN). Como su nombre lo indica, éstos son integrados por varias HKs, que pueden ser parte de distintos TCSs en los que la magnitud del estímulo va a ser el resultado de las múltiples interacciones, ya sea que promuevan o repriman una vía de señalización (Francis & Porter, 2019) [Fig. 3].

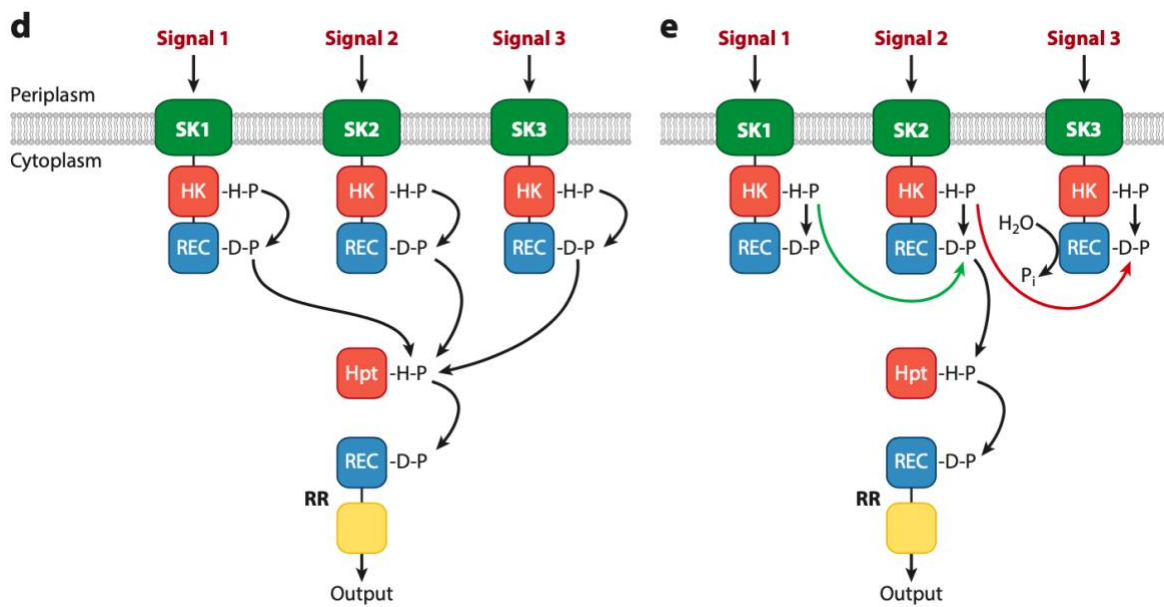


Fig. 3. Representación gráfica de unas redes multicinasa (MKN). d) Cinasas histidínicas híbridas que convergen en la fosforilación de un Hpt, el cual transfiere el fosforilo a un RR. e) Ejemplificación de redes multicinasa donde las HKs integrantes de la vía funcionan como activadores y represoras de la trasferencia del grupo fosforilo a un Hpt (Francis & Porter, 2019).

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*: generalidades y el TCS GacS/GacA.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista Gram negativa, perteneciente al género *Pseudomonas* y a la familia Pseudomonadaceae. Es un microorganismo de distribución ubicua y que habita en suelo, agua y en seres vivos. *P. aeruginosa* es una bacteria de importancia hospitalaria, ya que causa infecciones severas en pacientes vulnerables con fibrosis quística u hospitalizados con cáncer, quemaduras, al igual que en pacientes que se encuentren en la unidad de cuidados intensivos (Clarke, 1990; Golemi-Kotra, 2008).

P. aeruginosa emplea distintas estrategias en su colonización de su hospedero, una de ellas es el cambio entre los estilos de vida sésil y planctónico. En el último forma biopelículas que entre otras ventajas le confieren resistencia contra antibióticos y, por lo tanto, conlleva a una recurrencia de infecciones. La gran capacidad de esta bacteria para modular la expresión de su genoma se ejemplifica con el 8% de éste que codifica reguladores transcripcionales (Stover et al., 2000). En este segmento de su genoma se

encuentran codificados aproximadamente 64 TCSs (Rodrigue, Quentin, Lazdunski, Méjean, & Foglino, 2000). Dentro de los cuales el TCS GacS/A regula la transición de una infección aguda, caracterizada por ser más virulenta, a una crónica en la que se lleva a cabo la formación de biopelículas. Este se da a partir de la modulación de la expresión de un gran número de blancos a través del sistema de control postranscripcional Rsm (Ventre et al., 2006).

El TCS GacS/GacA se encuentra distribuido en un gran número de gamma proteobacterias (Lapouge, Schubert, Allain, & Haas, 2008). Su nombre proviene de “*for global antibiotic and cyanide control*” (Laville et al., 1992), dado que la mutación de *gacS* regula su síntesis. El TCS Gac está constituido por la HK heterodoxa GacS y su RR GacA. GacS fue originalmente descrito en *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* como un regulador clave de los factores de virulencia (Hrabak & Willis, 1992), mientras que GacA como un regulador maestro de metabolitos antifúngicos en *Pseudomonas protegens* (antes *Pseudomonas fluorescens*) CHA0 (Laville et al., 1992).

El estímulo que activa la cascada mediada por GacS no se ha identificado. Estudios en *P. protegens* CHA0 reportan que la expresión de los snc-RNAs del sistema Rsm aumenta en fase exponencial tardía. Además, la expresión dependiente de GacA aumenta a partir de una molécula extracelular producida al final de la fase exponencial. Ésto fue comprobado al tratar células con un extracto del sobrenadante de CHA0 (Heeb, Blumer, & Haas, 2002; Valverde, Heeb, Keel, & Haas, 2003).

Cuando GacS es estimulada en su dominio de entrada desencadena una cascada de señalización de tipo fosforrelevo hasta llegar a su dominio HPt. Éste tiene la función de fosforilar al RR GacA en su dominio REC, que tiene actividad como regulador transcripcional (TR). GacA fosforilado (GacA-P) se une río arriba de las regiones promotoras de los pequeños RNAs no codificantes (snc-RNAs) del sistema Rsm, promoviendo su expresión.

Especie.	Homólogo GacS/GacA.	Principales regulados por el GacS/GacA.	fenotipos por el TCS	Referencias.
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GacS/GacA	Alginatos, Poli-β-hidroxitirato (PHB) y enquistamiento		(Castañeda, Guzmán, Moreno, & Espín, 2000; Castañeda, Sánchez, Moreno, Núñez, & Espín, 2001; Trejo, Moreno, Cocotl-Yañez, & Espín, 2017)
<i>Escherichia coli.</i>	BarA/UvrY	Metabolismo central de carbono, formación de biopelículas, virulencia y movilidad.		(Zere et al., 2015)
<i>Legionella pneumophila</i>	LetS/LetA	Citotoxicidad, virulencia y movilidad.		(Sahr et al., 2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GacS/GacA	DAPG, HCN, pioluoeterina, pirrolnitrina, proteasas, fosfolipasa, resistencia a H ₂ O ₂ y movilidad.		(Heeb, Valverde, Gigot-Bonnefoy, & Haas, 2005; Cornelia Reimmann, Valverde, Kay, & Haas, 2005a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GacS/GacA	AHL, HCN, piocianinas, lipasas, elastasas, biopelículas, metabolismo de nitrógeno, virulencia y movilidad.		(Huang et al., 2019; Kay et al., 2006; Parkins, Ceri, & Storey, 2001; C Reimmann et al., 1997)

Tabla 1. Ejemplos de la distribución del TCS GacS/GacA y vías reguladas.

El sistema Rsm regula al metabolismo secundario, haciendo alusión a sus siglas de “*Repressor of secondary metabolites*” ya que *rsmA* fue asociado como un represor global de ellos (Cui, Chatterjee, Liu, Dumenyo, & Chatterjee, 1995). Otros autores lo definen como “*Regulator of secondary metabolism*” al sistema en conjunto. Este se encuentra constituido por snc-RNAs y RsmA. La última es una proteína que generalmente actúa como represor de la expresión de sus RNAs mensajeros (mRNAs) blanco de regulación. RsmA impide el acoplamiento del ribosoma y, por lo tanto, su traducción al unirse al sitio de unión del ribosoma (RBS) (Fig. 4.) (Lapouge et al., 2008). Los transcritos de snc-RNAs secuestran a RsmA por medio del asa de su estructura secundaria, liberando sus mRNAs blanco (Valverde et al., 2003; Valverde, Lindell, Wagner, & Haas, 2004). Este sistema, al

igual que el TCS GacS/GacA, se encuentra altamente distribuido en gamma proteobacterias. Los blancos de regulación de este sistema llegan a variar dependiendo del género y la especie bacteriana (Vakulskas, Potts, Babitzke, Ahmer, & Romeo, 2015) (Tabla 1).

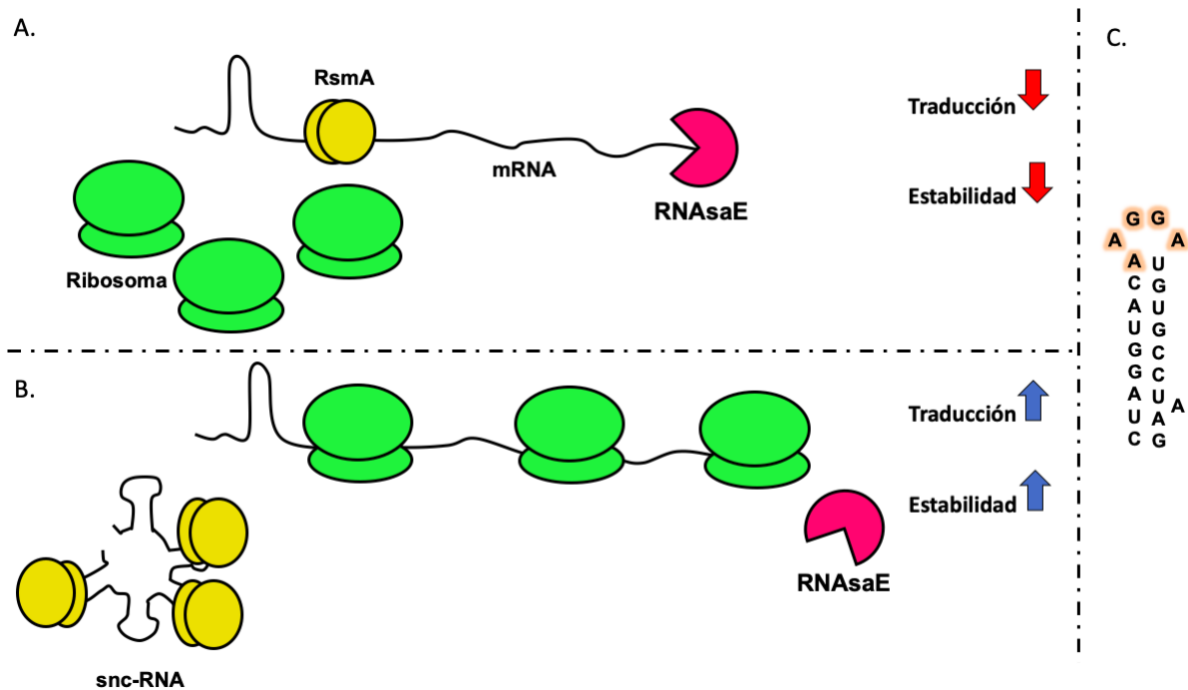


Fig. 4. Esquema del funcionamiento de Sistema. A.) Cuando RsmA se une a su mRNA blanco, evita su traducción al unirse cerca del sitio de unión al ribosoma (RBS). Al mismo tiempo, lo desestabiliza y promueve su degradación por una RNAsaE. B.) Cuando los pequeños RNAs no codificantes (snc-RNAs) del sistema Rsm son expresados adoptan una estructura secundaria en la que sus asas secuestran a RsmA. A partir de ello, el mRNA blanco de RsmA se puede traducir. C.) Estructura secundaria de tallo y asa que se forma de los transcritos de los snc-RNAs. En sus asas se resalta la secuencia reconocida por RsmA.

En la familia en las Pseudomonadaceae estas moléculas de RNA se han clasificado en cinco familias de acuerdo con su secuencia y su estructura secundaria, en: RsmV, RsmW, RsmX, RsmY y RsmZ. Tal clasificación fue realizada en *P. protegens* CHA0, donde fueron clasificadas las últimas tres (S et al., 2010), mientras que los primeros dos fueron descritos en años posteriores en *P. aeruginosa*. Aunado a ello, RsmV y RsmW han sido los únicos snc-RNAs de este sistema, cuya regulación no ha sido asociada al TCS GacS/GacA. Incluso, se ha propuesto un distinto origen evolutivo (CL et al., 2016; Janssen, Diaz, Gode, Wolfgang, & Yahr, 2018).

El otro componente de este sistema es la proteína de unión a mRNA, RsmA. Ésta es homóloga a CsrA de *E. coli* (Cui et al., 1995). Aunque el sistema prototipo está constituido solamente por una proteína, en algunas especies existe la presencia de parálogos. Éstas proteínas son RsmF (RsmN) y RsmE. Las tres proteínas tienen blancos similares, por lo que llega a haber cierta redundancia en sus roles. Aun así, las secuencias que reconocen difieren entre sí por lo que algunos blancos de regulación son únicos, como en el caso de RsmF.

RsmE se reportó en *P. protegens* CHA0, actuando de manera sinérgica con RsmA. Aunque las diferencias en expresión, de ambas, sugiere una regulación independiente, aunque exista redundancia en sus blancos. A lo largo de la curva de crecimiento los niveles de RsmA aumentan moderadamente a diferencia de los de RsmE que llegan a su pico en fase estacionaria (Cornelia Reimann, Valverde, Kay, & Haas, 2005b). RsmF difiere en parte en la secuencia consenso que reconoce, respecto a RsmA y RsmE. A pesar de ello, llega a tener blancos similares, pero también tiene blancos únicos. Esta proteína solamente se ha identificado en *P. aeruginosa*, en la que la supresión de *rsmF* no genera una disparidad respecto a la WT (Silvestre). Sin embargo, al generar a una doble mutante *rsmA- rsmF*, el efecto observado es exacerbado respecto a la mutante sencilla en *rsmA*. Esto sugiere el posible papel sinérgico de RsmF en la red de regulación de RsmA. Aun así, los snc-RNAs del sistema Rsm presentan una baja afinidad por RsmF *in vitro* (Marden et al., 2013; Morris et al., 2013).

1.1.3 Las cinasas histidínicas híbridas LadS y RetS en *P. aeruginosa*.

Se ha reportado que en *P. aeruginosa* la cascada GacS/A-Rsm es regulada por las HKs híbridas LadS y RetS. Estas proteínas actúan en ésta al regular los niveles de GacA-P, a partir de reprimir o estimular a la HK heterodoxa GacS (Fig. 6). Se ha reportado que LadS es un activador del sistema que ingresa grupos fosforilo a la cascada Gac/Rsm (Mancl, Ray, Helm, & Schubot, 2019). Tal actividad es estimulada por la concentración de Ca²⁺ (Broder, Jaeger, & Jenal, 2016), promoviendo la formación de un homodímero

de LadS y autofosforilación. Aunque, al carecer de dominio HPt, transfiere el grupo fosforilo al HPt (H2) de GacS permitiendo el fosforrelevo a GacA. Tal aumento del RR fosforilado permite la transición de una infección aguda a una crónica. En tal estadio se promueve la expresión de los genes requeridos en la formación de biopelículas. Entre ellos se encuentran los clústers *pel* y *psl*, necesarios la síntesis de polisacáridos que son parte de esta estructura (Chambonnier, Redelberger, Fadel, & Filloux, 2016; Mikkelsen, Sivaneson, & Filloux, 2011).

RetS y LadS presentan una organización similar de sus dominios. Ambas poseen un dominio de entrada en su N-terminal 7TMR-DISM_7TM (*7TM Diverse Intracellular Signalling*), seguido de uno 7TMR-DISM_7TM en la región transmembranal; en la región citoplasmática un dominio transmisor (constituido por un HisKA y HATPasa) y un dominio REC, que en el caso de RetS son dos (Ventre et al., 2006) [Fig.5]. Dado que existe una gran especificidad del ligando del dominio de entrada, su determinación es difícil. En el caso del dominio 7TMR-DISM_7TM se ha propuesto que detecta moléculas basadas en carbohidratos (Anantharaman & Aravind, 2003).

Respecto a la molécula detectada por RetS, primeros reportes informan que es activada cuando se añade un lisado de *P. aeruginosa* al medio. Tal extracto activa la respuesta de ***P. aeruginosa* al antagonismo** (PARA), aunque en este caso la molécula señalizadora no fue aislada (LeRoux et al., 2015). Posteriormente se encontró que la expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS) y la formación de biopelículas es regulada a la baja al tratar a *P. aeruginosa* con glucanos de mucina (KM et al., 2019). Dado que la cascada Gac/Rsm está involucrada en la regulación de este sistema y el dominio de entrada de RetS pudiese ser aquel que detectara moléculas de esta naturaleza, éstos podrían actuar a través de ella. Asimismo, se encontró relación de la mutación de *retS* y la nula represión de la expresión del T6SS con el tratamiento con glucanos de mucina. Por lo cual, se apoyaba a que RetS estaba involucrado en la en la detección de estas moléculas a base de carbohidratos. Aunque debido a la riqueza de isoformas de los glucanos dificulta la exploración de la molécula señalizadora (Wang et al., 2020). Aunado a ello, falta por esclarecer si la molécula que señala a través de RetS

del lisado de *P. aeruginosa* es similar a los glucanos de mucina. De igual manera como estos compuestos pueden activar y reprimir la actividad de esta proteína.

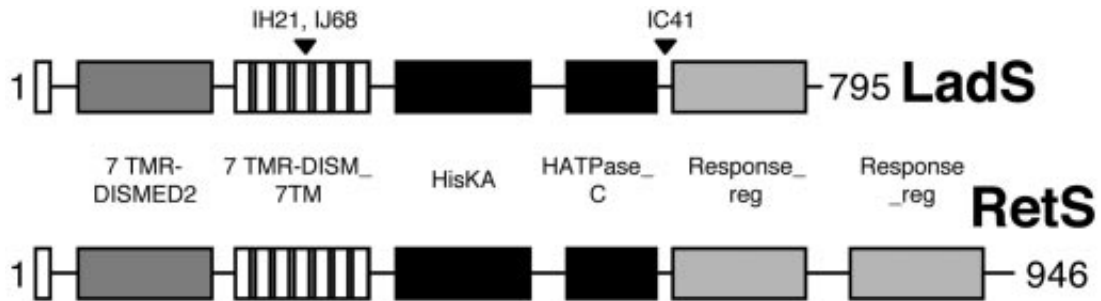


Fig. 5. Organización de los dominios de LadS y RetS (Ventre et. al., 2006).

RetS fue originalmente reportado como un antagonista de la HK GacS (Goodman et al., 2004). Se hipotetizaba la presencia de dos vías independientes que tenían los mismos blancos. En años subsecuentes se propuso que la actividad represora de RetS se daba a partir de la formación de heterodímeros con GacS, los cuales inactivarían a ésta. Tal formación inhibiría la homodimerización de la última y su consecuente autofosforilación (F. Vincent et al., 2010). Con ello los niveles de GacA-P y de los nc-sRNAs del sistema Rsm disminuirían.

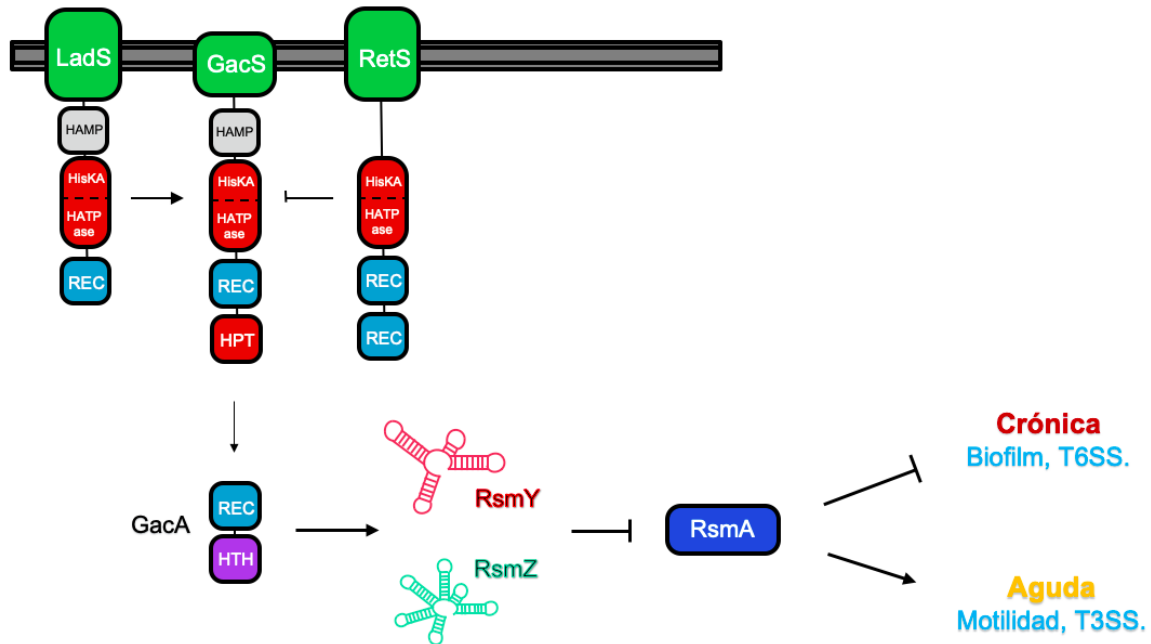


Fig. 6. Cascada Gac/A-Rsm en *P. aeruginosa* y sus blancos de regulación. Adaptado de (Francis et. al, 2018).

En 2018 se proponen tres mecanismos por los cuales RetS regularía negativamente a GacS de *P. aeruginosa* (Francis et al., 2018). Tales datos fueron obtenidos a partir de realizar mutaciones puntuales en los residuos conservados y cruciales del fosforrelevo de los dominios constituyentes de ambas proteínas. Subsecuentemente, a partir de ensayos de fosforrelevo, observaron la vía de transferencia del grupo fosforilo entre las HKs. Con ello surgió los tres mecanismos que a partir de éstos augura una complejidad mayor a lo previamente esperado y propuesto.

El primer mecanismo sería llevado a cabo por el dominio REC2 de RetS, el cual va a trasegar el grupo fosforilo del dominio HisKA/DHp de GacS hacia su Asp, una vez que se lleve a cabo la autofosforilación. Para el segundo mecanismo hay que mencionar que una característica de las cinasas de la familia HisKA, que llegan a poseer una actividad dual, de cinasa y fosfatasa. Esta actividad sería llevada a cabo por el dominio HATPasa/CA, el cual va a interrumpir el fosforrelevo a GacA, a partir de promover la hidrólisis del enlace entre el residuo de Asp y el grupo fosforilo, con la liberación de P_i en el dominio REC de GacS. Mientras que el tercer mecanismo, sería a partir de la

interacción directa que entre ambas cinasas (Fig. 7). Sumado a ello, un estudio posterior propone que RetS no inhibe la formación de homodímeros de GacS, sino que utiliza un desdoblamiento reversible de una hélice de RetS o ruptura de hélice, para evitar la autofosforilación de GacS pero no evita su homodimerización (Mancl et al., 2019). Por lo tanto sería un nuevo mecanismo, no descrito previamente de interacción entre HKs y opuesto a lo propuesto (F. Vincent et al., 2010). Cabe añadir que los primeros dos mecanismos de interacción entre las cinasas ha sido replicado en un consecuente estudio, por lo que es altamente probable que se lleve a cabo la interacción por estos mecanismos (Wang et al., 2020).

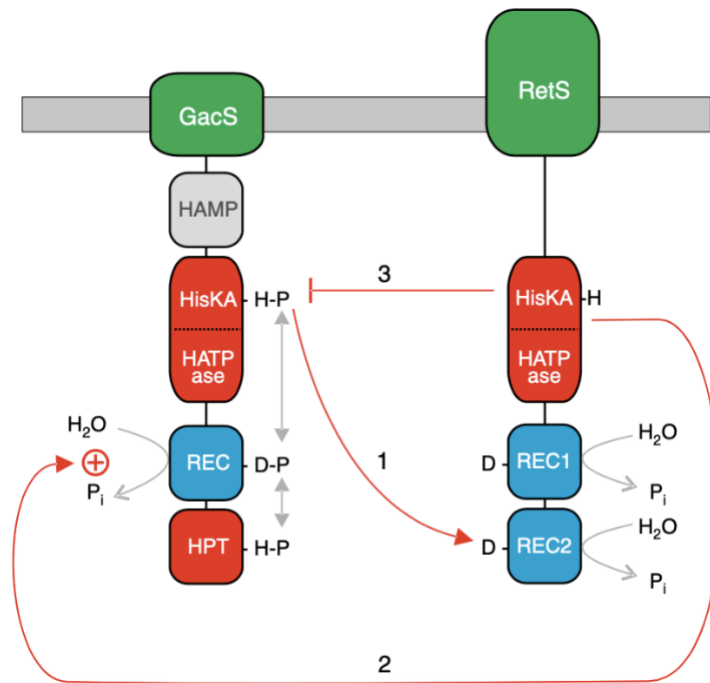


Fig. 7. Esquema de los mecanismos propuestos que ejerce RetS sobre GacS (Francis et. al., 2018)

1.1.4 Vía alternativa Hpt en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* no solamente el TCS GacS/A se encuentra involucrado en la expresión de los snc-RNAs del sistema Rsm. A la par, existe una vía alternativa a la red GacS/A la cual es denominada la vía HptB. Ésta se encuentra constituida por tres HKs híbridas llamadas: PA1611, ErcS' y SagS; una histidín fosfotransferasa (HptB); un RR (HsbR); un

antagonista del factor anti-sigma (HsbA); un factor anti-sigma (FlgM); un factor sigma (FliA) y una diguanilato ciclasa (HsbD) (Francis & Porter, 2019).

Al inicio de la vía se encuentran las HKs híbridas, que al carecer de un dominio HPt, transfieren el grupo fosforilo a un HPt soluble, en este caso HptB. Una vez que esta proteína se encuentra fosforilada va a transferir el grupo fosforilo al RR atípico HsbR (Bouillet, Ba, Houot, Iobbi-Nivol, & Bordi, 2019). A diferencia de la mayoría de los RR esta proteína contiene dos dominios de salida, uno con actividad fosfatasa (PP2C) y uno con actividad cinasa/factor anti-sigma (Ser/Thr). Cuando HsbR se encuentra fosforilada su dominio PP2C defosforila a HsbA, que en este estado se une a FlgM permitiendo que FliA induzca la expresión de los genes flagelares. En contraparte, cuando HsbR no está fosforilada, su dominio cinasa fosforila a HsbA. En este estado forma un complejo con HsbD promoviendo su localización en los polos de la célula y por un mecanismo todavía no esclarecido, promueve la expresión del snc-RNA RsmY. Por ende, al no estar unido FlgM a HsbA, se forma un complejo con FliA, reprimiendo la expresión de los genes flagelares (Valentini, Laventie, Moscoso, Jenal, & Filloux, 2016) [Fig. 8].

Un punto de unión de los sistemas es RetS en los que se ha reportado que PA1611 es un represor de RetS (AY et al., 2017). Además se ha propuesto que HptB-P puede transferir el grupo fosforilo al dominio REC2 de RetS (Bordi et al., 2010). Por lo tanto, a través de estas proteínas se aumentan los niveles de GacA-P. Aun así, los bajos niveles de expresión de PA1611 y las dudas sobre la fosforilación reversa de RetS dejan incógnitas de sus roles en la represión de la HK híbrida.

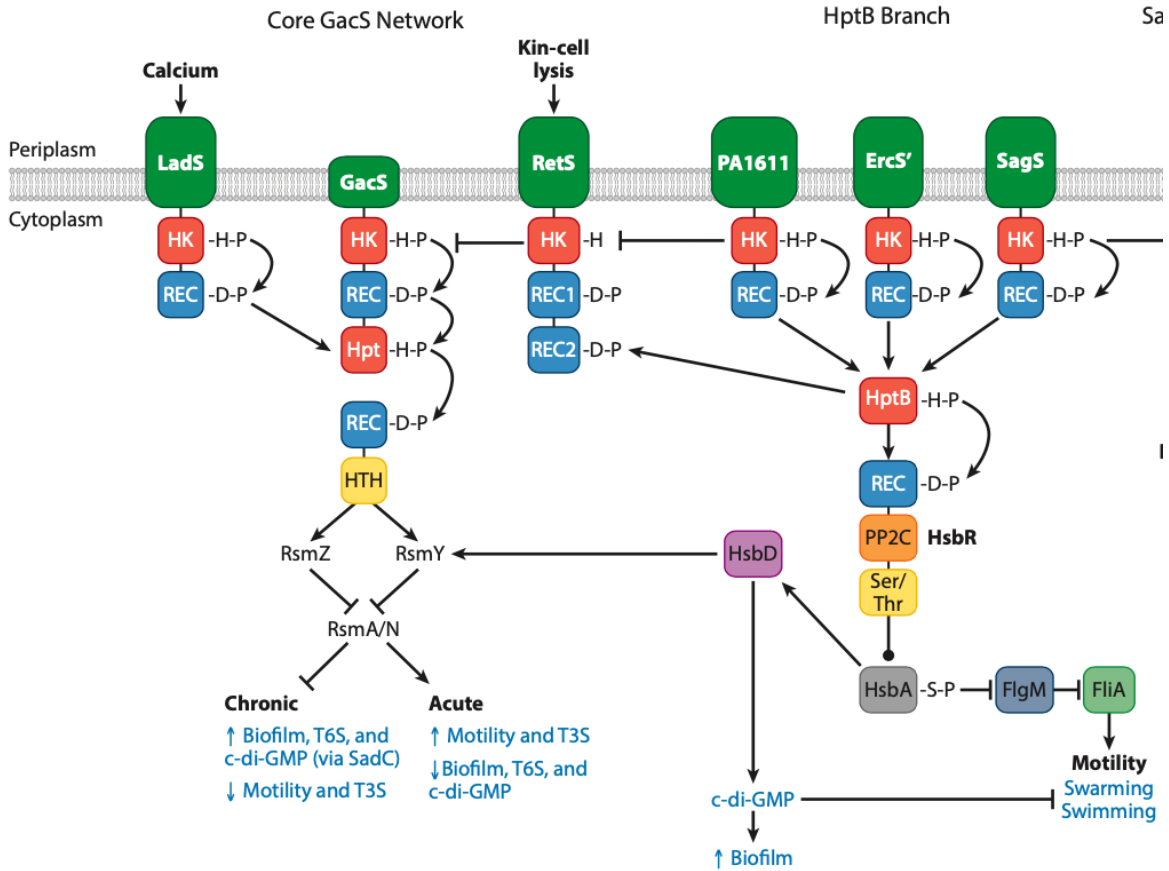


Fig. 8. Representación de los integrantes de la cascada Gac y la rama HptB (Francis & Porter, 2019).

1.1.5 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii es una γ -proteobacteria del género *Azotobacter* y la familia Pseudomonadaceae. Es una bacteria de vida libre, Gram negativa y aerobia y fija nitrógeno en condiciones aerobias. Razón, por la cual, requiere proteger a sus nitrogenasas a partir de controlar los niveles de oxígeno en el citoplasma, como a partir de una alta tasa respiratoria, y la producción de metabolitos extracelulares, entre otros mecanismos. Tiene un cromosoma de 5.36 Mbp, del cual llega a tener hasta 80 copias en fase estacionaria, por lo que es denominada poliploide (Maldonado, Jiménez, & Casadesús, 1994; Setubal et al., 2009).

Esta bacteria presenta dos estadios de vida, uno vegetativo y otro de latencia. En el primer estadio las células presentan una morfología pleomórfica, que va desde una bacilar a una cocoide; capaz de movilizarse a través de flagelos peritricos. Cuando las células llegan a fase estacionaria tardía cerca del 1% va a diferenciarse en estructuras latentes (Fig. 9) (Lin & Sadoff, 1968). La diferenciación es estimulada en condiciones adversas para su desarrollo. Asimismo, los cuerpos latentes pueden ser inducidos en cultivos con compuestos orgánicos simples, como etanol y butanol, entre otros (JENSEN, 1954). Esta estructura llega a tener una vida media de meses hasta años y en caso de ser requerido puede promoverse su germinación cuando las condiciones ambientales son adecuadas (J. Moreno, Gonzalez-Lopez, & Vela, 1986; Socolofsky & Wyss, 1961; SOCOLOFSKY & WYSS, 1962)

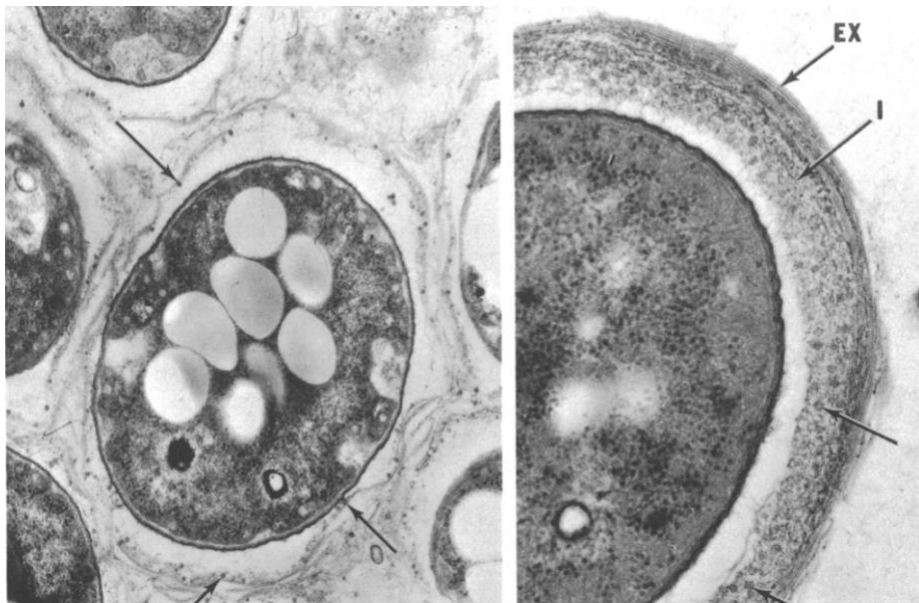


Fig. 9. Microscopía electrónica de transmisión del quiste. EX: exina. I: intina (Sánchez Cuapio, 2012).

Las estructuras celulares latentes formadas por *A. vinelandii* se denominan quistes, los cuales son resistentes a la desecación. En el proceso de diferenciación, se lleva a cabo una última división celular que da lugar a una célula esférica, de fase brillante, llamada cuerpo basal. En esta estructura los fosfolípidos de la membrana son intercambiados por lípidos fenólicos, principalmente los alquilresorcinoles (ARs). En el interior de esta estructura hay un cúmulo de gránulos de PHB, que son utilizados como reserva de

carbono. Asimismo, el cuerpo basal está aislado del ambiente por una cápsula modificada llamada intina. Además de ella, una capa externa, la exina, envuelve a la intina (Fig. 9) (Hitchins & Sadoff, 1970; Lin & Sadoff, 1968; Reusch & Sadoff, 1983). Éstas se encuentran constituidas por alginato (13% y el 32%, respectivamente), lipoproteínas y, en el caso de la última, también por lípidos fenólicos (Campos et al., 1996; Reusch & Sadoff, 1983).

1.1.6 Regulación de los metabolitos de interés industrial por la cascada Gac/Rsm.

Como se ha mencionado previamente, *A. vinelandii* es capaz de sintetizar algunos metabolitos secundarios. Estos son parte esencial en el éxito de esta bacteria en sus distintos ambientes. Dentro de los cuales se encuentran los alginatos, las alquilpironas, los alquilresorcinoles, los sideróforos y los polihidroxicanoatos (PHA) [principalmente el PHB]. Éstos tienen aplicaciones en diversas industrias, por lo que existe un interés biotecnológico en esta bacteria del mecanismo de regulación de aquellos compuestos, que permitirá generar cepas óptimas para su obtención (Galindo, Peña, Núñez, Segura, & Espín, 2007).

El TCS GacS/GacA se encuentra involucrado en la regulación de los metabolitos de interés industrial. GacS/GacA regula positivamente la expresión de los snc-RNAs del sistema Rsm. En *A. vinelandii* encontramos a los snc-RNAs de la familia Z y de la familia Y. A diferencia de *Pseudomonas*, en *A. vinelandii* se ha reportado la iteración génica del snc-RNA RsmZ con ocho alelos. Aunado a ello, solamente hay un alelo del snc-RNA RsmY. Asimismo, no se ha reportado la presencia de RsmW, RsmV y RsmX (Hernandez-Eligio et al., 2012; Manzo et al., 2011).

1.1.6.1 Alginatos

Los alginatos son heteropolisacáridos aniónicos lineales. Éstos son constituidos por el ácido β -D-manurónico (M) y su epímero, ácido α -L-gulurónico (G). Los cuales se unen por un enlace glucosídico β -(1-4). Ellos se encuentran en heterobloques (GM) u homobloques (GG o MM) poliméricos (Fig.10). Las propiedades gelificantes de los

alginatos, cambian sus propiedades dependiendo de la proporción de M-G. Los cuales están relacionados con la interacción del ácido α -L-gulurónico con iones divalentes, como el Ca^{2+} . Por lo tanto, una alta concentración GG y/o frecuencia de las subunidades G permitirá la obtención de geles más rígidos (Clementi, 1997; P, 1998).

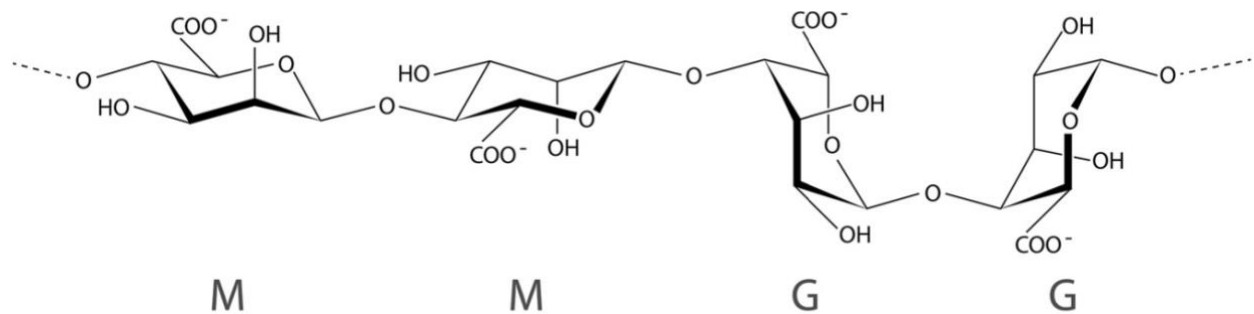


Fig. 10. Componentes estructurales de los alginatos (Hay et. al, 2013).

El interés biotecnológico de este polímero radica en sus aplicaciones en diversas industrias, ya sea la alimentaria, farmacéutica, textil, entre otras (Hay, Rehman, Moradali, Wang, & Rehm, 2013). Aunque la dificultad para obtener alginatos de peso molecular específico dificulta su uso. La principal fuente del polímero, en la actualidad, la constituye las algas cafés. Asimismo, la composición de este polímero es afectada por las condiciones ambientales. Por consecuencia, la heterogeneidad de los alginatos obtenidos dificulta su uso a gran escala. Razón por la cual, el alginato sintetizado por bacterias representa una buena alternativa ya que las enzimas involucradas en su formación pueden ser modulables. Por consiguiente, los alginatos obtenidos por esta fuente pueden ser de los pesos moleculares requeridos para sus diversos usos (Pacheco-Leyva, Guevara Pezoa, & Díaz-Barrera, 2016).

Para cumplir el papel del heteropolímero en la fisiología de la bacteria se requiere su exportación. Dado que permite generar una barrera difusora de oxígeno, para regular los niveles citoplasmáticos. Además, funciona como una protección contra metales pesados y permite obtener resistencia contra la desecación.

Los genes involucrados en su síntesis se encuentran codificados en un clúster. Donde la mayoría de ellos son codificados en el operón *algD844KJGXLIVFA* y río abajo se

encuentra otro, regulado de manera independiente (Fig. 11). Dentro del operón se ha reportado la presencia de promotores internos que podrían modificar los niveles de expresión de los genes involucrados. A partir de ello se da el arreglo de la siguiente manera, al inicio del clúster se encuentra *algD*, regulado por tres promotores; río abajo los genes *alg8-J*, que son regulados por otro promotor; *algG-F* se encuentran regulados por otro promotor; y, por último, *algA* contiene otro promotor. En contraparte, *algC* se encuentra río abajo del clúster, regulado de manera independiente por dos promotores (Castañeda et al., 2001; G et al., 2004; H, J, S, G, & G, 1997; Lloret et al., 1996; S. Moreno, Nájera, Guzmán, Soberón-Chávez, & Espín, 1998; Vazquez, Moreno, Guzmán, Alvarado, & Espín, 1999). Aunado a ello, otros genes involucrados en su modificación son codificados en otros locus. Entre ellos los genes *alyA1-3/B*, que codifican para liasas. Entre éstos, AlyA3 juega un papel importante en la germinación del quiste (Ertesvåg, 2015; Gimmetstad et al., 2009). Mientras que los genes *algE1-7* codifican para enzimas requeridas para la epimerización de bloques que no sean acetilados. Siendo importantes para la formación de quistes resistentes a la desecación (Ertesvåg, Høidal, Schjerven, Svanem, & Valla, 1999; M et al., 2008).

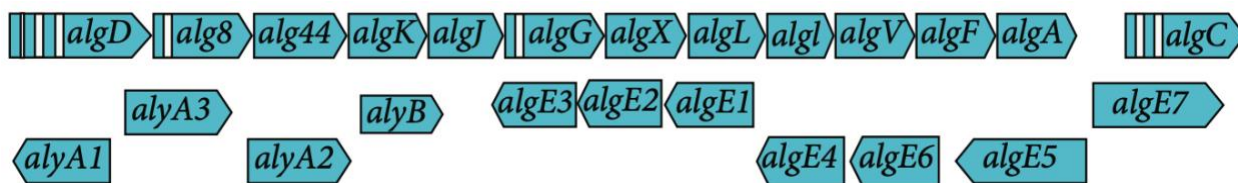


Fig. 11. Arreglo genético de los genes involucrados en la síntesis de alginatos en *A. vinelandii* (Pacheco-Leyva, Pezoa & Díaz-Barrera, 2016).

En *A. vinelandii*, la cascada Gac/Rsm regula una de las enzimas claves para su síntesis, la GDP-manosa deshidrogenasa (*algD*). La cual compromete la GDP-manosa hacia la vía de síntesis de alginatos, al oxidarse a ácido GDP-manurónico. La transcripción de este gen se realiza a partir de tres promotores (*algDp1- σ^S* , *algDp2-AlgU/ σ^E* y *algDp3-* del cual no se ha reportado su factor sigma) (Castañeda et al., 2001; S. Moreno et al., 1998). Otro mecanismo de regulación de *algD* es a partir del mRNAs, el cual es blanco de RsmA. Por lo que cuando se expresan los snc-RNAs del sistema Rsm se promueve la síntesis de alginato (Manzo et al., 2011).

La vía de síntesis de alginatos se puede dividir en tres fases: la síntesis de los precursores, la fase de polimerización del compuesto y la modificación y secreción. En la primera fase se va a formar al ácido GDP-manurónico, a partir de la fructosa-6-fosfato (F6P) por AlgA, AlgC y AlgD. La segunda fase es llevada a cabo por las enzimas Alg8 y Alg44. Asimismo, AlgK está involucrada en la estabilización de ellas. Mientras que la tercera fase se encuentran involucradas las enzimas restantes (Urtuvia, Maturana, Acevedo, Peña, & Díaz-Barrera, 2017).

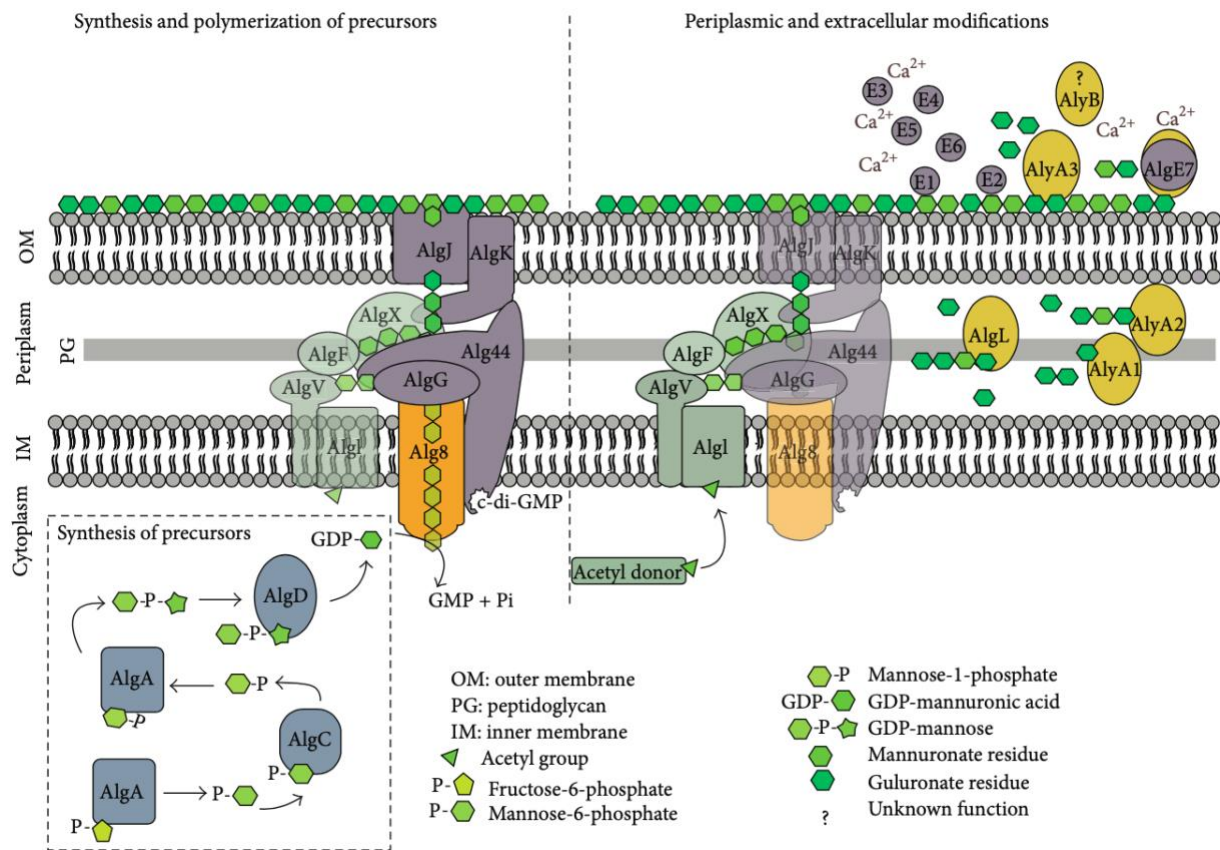


Fig. 12. Vía de síntesis de alginatos en *A. vinelandii* (Pacheco-Leyva, Pezoa & Díaz-Barrera, 2016).

1.1.6.2 Alquilresorcinoles y las Alquilpironas

Los alquilresorcinoles (ARs) y las alquilpironas (APs) son lípidos fenólicos que consisten en un anillo aromático hidrofóbico y cadenas alifáticas saturadas de longitud variable. Éstos son principalmente sintetizados por plantas, hongos y bacterias y entre éstas encontramos a *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y *Azotobacter* (Kozubek* & Tyman, 1998; Stasiuk & Kozubek, 2010). De los principales ARs sintetizados se encuentran los 5-heneicosilresorcinol, el 5-n-tricosilresorcinol y sus derivados galactósidos, mientras que las APs son una mezcla de tricétido y tetracétido pironas (Funa, Ozawa, Hirata, & Horinouchi, 2006; Reusch & Sadoff, 1979). En *A. vinelandii*, éstos son sintetizados únicamente durante el enquistamiento como componentes principales de la exina y la membrana (Reusch & Sadoff, 1983). Aunque solo se sintetizan en la diferenciación a quistes, mutantes que no producen estos lípidos fenólicos llegan a formar estructuras latentes resistentes a la desecación, por lo que no son esenciales para éstos. Aun siendo esto, la falta de ARs genera una exina desorganizada, por lo que pudieran tener un papel estructural (Funa et al., 2006; D. Segura et al., 2009).

Las enzimas involucradas en la síntesis de estos lípidos fenólicos se codifican en el operón *arsABCD* (Fig. 13A.). Los genes *arsA* y *arsD* codifican para una sintasa de ácidos tipo I. Mientras que *arsB* y *arsC* codifican para policétido sintasas (PKSs) de tipo III de alquilresorcinoles y alquilpironas, respectivamente (Funa et al., 2006). *ArsA* presenta varios dominios: ER, KS, MAT, ACP y KR. Mientras que *ArsD* solo presenta dos dominios: DH y PPT (Fig. 13C.) (Mander & Liu, 2010; Miyanaga, Funa, Awakawa, & Horinouchi, 2008).

Las policétido sintasas son enzimas que sintetizan una gran cantidad de compuestos, denominados policétidos. Éstos son compuestos con alta diversidad estructural y contienen una alta concentración de carbonilos y alcoholes generalmente separados por carbonos de metileno. Tal diversidad de compuestos es dada por el sustrato que es reconocido por la policétido sintasa particular. Aunque las PKSs son específicas para un policétido, existen casos donde se pueden utilizar distintos sustratos iniciales o de extensión. Por lo tanto la promiscuidad de las PKSs darán una amplia gama de

metabolitos secundarios (Collie & Myers, 1893; Fischer, 2014; Richardson & Khosla, 1999).

Los sustratos de las PKSs ArsB y ArsC son sintetizados a partir de ArsA y ArsD. Los cuales generarán ácidos grasos C₂₁-C₂₃ (Funa et al., 2006; Miyanaga et al., 2008). Éstos van a ser donados por el dominio ACP de ArsA a las PKSs (Miyanaga et al., 2008). Una vez donado, ambas catalizarán tres reacciones de extensión utilizando malonil-CoA para generar a un mismo compuesto, un intermediario tetracétido. A partir de este, las reacciones consecuentes se bifurcarán para la síntesis de los ARs y APs. Asimismo, ArsC puede catalizar solamente dos reacciones de extensión que generarán a un intermediario tricétido. Consecuentemente, se cataliza una lactonización para formar a las tricétido pironas. Mientras que en el caso de que se sintetice al intermediario tetracétido, darán lugar a las tetracétido pironas a partir de la misma reacción. En contraparte, ArsB lleva a cabo una condensación aldólica descarboxilativa utilizando al intermediario tetracétido para el rendimiento de ARs [Fig. 13B.] (Funa et al., 2006; Miyanaga & Ohnishi, 2019; Satou et al., 2013).

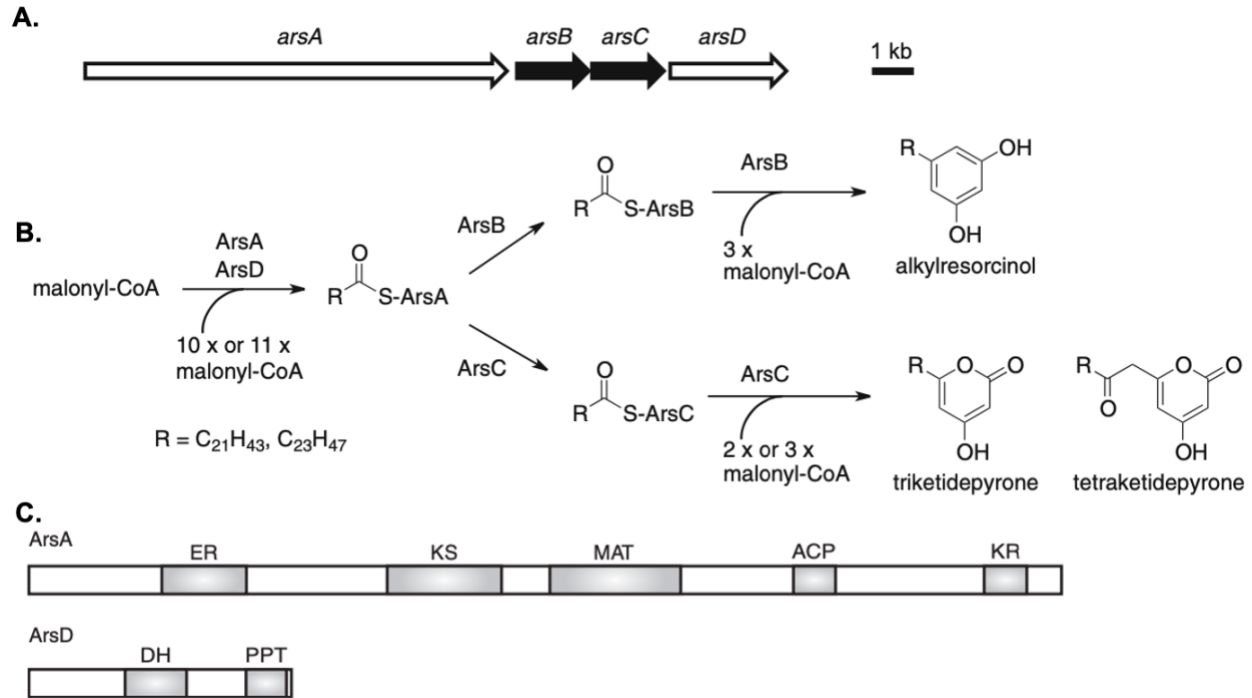


Fig. 13. A.) Arreglo del operón *ars*. B.) Esquema de la vía de síntesis de alquilresorcinoles y alquiltironas en *A. vinelandii*. C.) Ilustración de los dominios funcionales sintasas de ácidos grasos, ArsA y ArsD (Mander & Liu, 2010; Miyanaga & Ohnishi, 2019).

La expresión de los genes involucrados en la síntesis, de estos lípidos fenólicos, es regulada positivamente por el TCS GacS/A, el cual regula indirectamente al operón *ars* a partir de regular a *arpR* a partir de tres vías. Este gen codifica para un regulador transcripcional de tipo Lys-R, que es el activador del operón. La primera vía de regulación se da a partir del sistema Rsm con el mRNA de *arpR* como blanco de RsmA. De igual manera, se ha reportado que los snc-RNAs RsmZ1-5 y RsmY están involucrados en su expresión (López-Pliego et al., 2018, 2020; Romero et al., 2016). Otra vía se da a partir del factor sigma S, que reconoce a la región promotora de *arpR* (Castañeda et al., 2001; Romero, Moreno, Guzmán, Espín, & Segura, 2013). Mientras que la tercera vía de regulación se produce partir de un sistema de fosfotransferencia relacionado con nitrógeno, el sistema PTS^{Ntr}. En éste la vía converge en la regulación de *rpoS*, requerido para la expresión de *arpR*.

Los sistemas de fosfotransferencia son un grupo de enzimas que transfieren grupos fosfato, donados del fosfoenolpiruvato (PEP), de un miembro del sistema a otro en un orden establecido. Dos tipos de sistemas han sido descritos, los PTS asociados al transporte de carbohidratos y los relacionados a nitrógeno (PTS^{Ntr}), que no transportan carbohidratos, pero que tienen roles reguladores importantes (Pflüger-Grau & Görke, 2010). En *A. vinelandii* el sistema PTS^{Ntr} está constituido por tres proteínas: EI^{Ntr}, NPr, EIIA^{Ntr} (Noguez et al., 2008). El aceptor inicial del fosfato es EI^{Ntr}, el cual va a transferirlo a NPr y consecuentemente lo dona a EIIA^{Ntr} (Noguez et al., 2008). Asimismo, se ha asociado el estado no fosforilado de EIIA^{Ntr} a una represión de la síntesis de los lípidos fenólicos (Muriel-Millán et al., 2015). Aunado a ello, un fondo genético *gacA*⁻ en *A. vinelandii* promovía el estado defosforilado de EIIA^{Ntr} (Trejo et al., 2017). La vía por la cual se lleva a cabo su represión no está bien esclarecida, aunque se sugiere que el sistema actúa a partir de una vía induce la degradación de σ^S , a partir del complejo proteosomal ClpAP (Luis Felipe, Soledad, Ramsés, & Guadalupe, 2017) [Fig. 14].

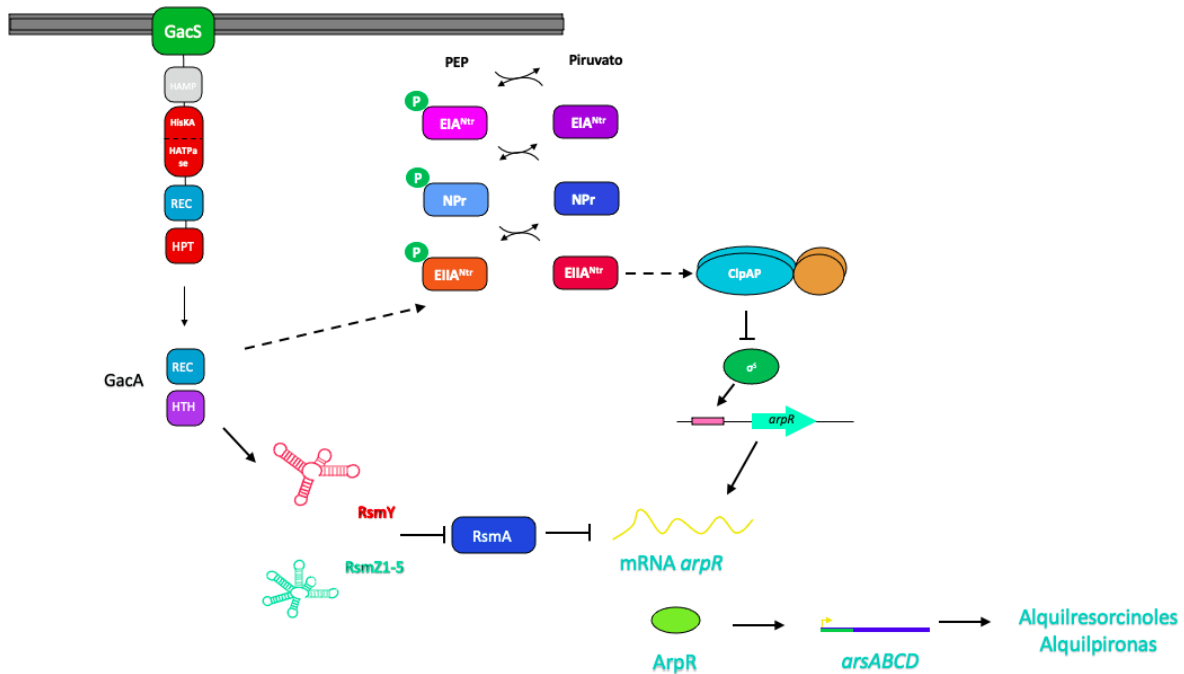


Fig. 14. Representación de las vías involucradas en la regulación del operón *arsABCD*, requerido para la síntesis de alquilresorcinoles y alquilpironas. Adaptado de (Francis & Porter, 2019)

1.2 Antecedentes específicos.

1.2.1 RetS y LadS en *Azotobacter vinelandii*.

En una búsqueda bioinformática previa de los genes *retS* y *ladS* en el genoma de *A. vinelandii* se encontró un locus *retS* con un 48% de identidad con el gen *retS* de *P. aeruginosa* en el alineamiento de nucleótidos y 57% de aminoácidos. Posteriormente se realizó el ensayo de doble híbrido para determinar si la proteína RetS interactúa con la proteína GacS (Sánchez Cuapio, 2012). El sistema utilizado está basado en la reconstitución de la proteína represora LexA, que impide la transcripción del gen *lacZ* cuando las proteínas ensayadas presentan interacción, por lo que el fenotipo observado en *E. coli* es la represión de la fermentación de lactosa (Daines, Granger-Schnarr, Dimitrova, & Silver, 2002).

El fenotipo observado cuando la proteína es reconstituida a través de la formación del heterodímero GacS-RetS se distingue a través de la represión de la expresión del gen *lacZ* lo que no permite la fermentación de lactosa y por lo tanto no se presenta el viraje de color a rosa pálido en placas de agar McConkey. A través de este sistema se encontró una interacción entre RetS y GacS. En contraparte, no se observó una interacción aparente entre LadS y GacS (Fig. 15) (Sánchez Cuapio, 2012).

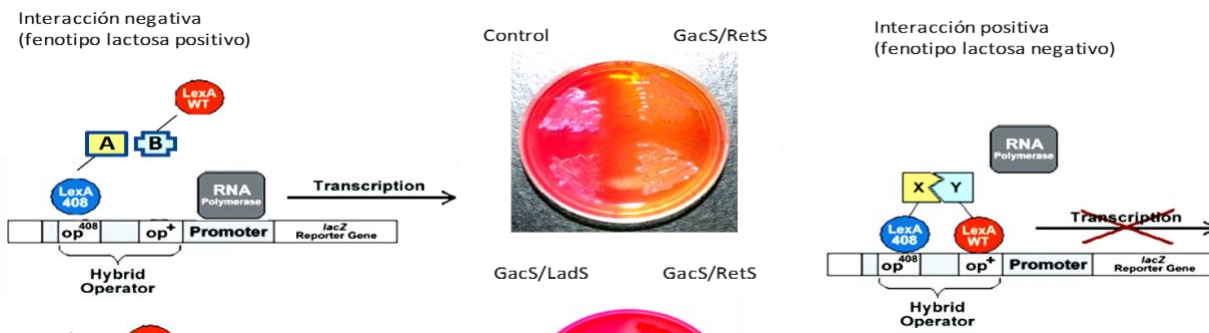


Fig. 15. Sistema de doble híbrido. En el esquema izquierdo se ejemplifica un tipo de interacción negativa, mientras que el derecho una positiva. En el centro de la figura es una placa de agar McConkey. Donde se muestra a las distintas cepas que contenían en doble híbrido (Sánchez Cuapio, 2012).

1.2.2 Mutante AEIVretS::gm en *Azotobacter vinelandii*.

Una vez que se comprobó que la cinasa RetS interactuaba con GacS, el siguiente paso era determinar el efecto de la mutación de aquel gen sobre los fenotipos controlados por la vía. Para ello se generó una mutante a partir de la inserción de un casete de resistencia a Gentamicina (Gm). Tal mutación fue dirigida a la secuencia que codifica para las hélices transmembranales. Para caracterizar a la mutante AEIVretS::gm se cuantificaron los fenotipos controlados por el TCS GacS/GacA. El primero a ser cuantificado fue el alginato por ser el metabolito controlado por la vía de mayor facilidad de medición. Como se puede observar en la Fig. 16, la mutante AEIVretS::km mantenía una tendencia de síntesis a la baja, similar a la del control negativo, AEIVgacA::gm. Lo cual no concordaba con lo esperado de la mutación de un regulador negativo, como ya estaba reportado en *P. aeruginosa* (Reyes Nicolau, 2018).

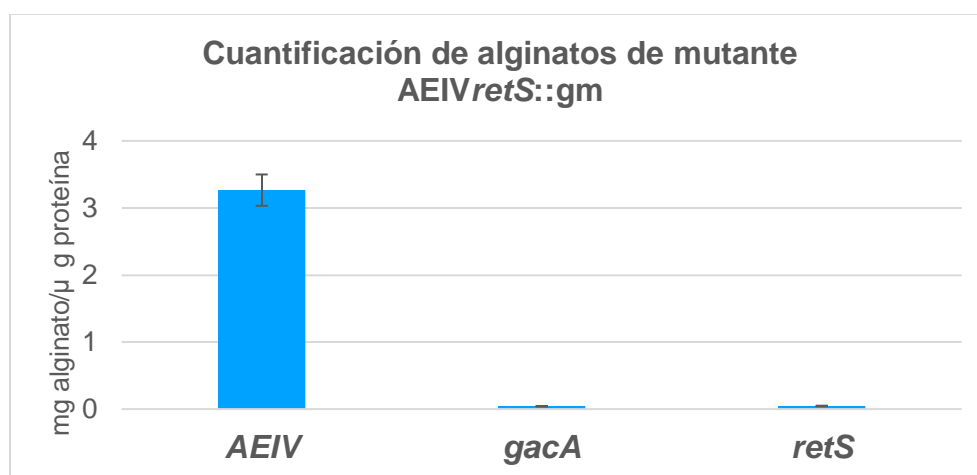


Fig. 16. Gráfica de cuantificación de alginatos de la mutante AEIVretS::gm (Reyes Nicolau, 2018).

Como los datos obtenidos no concordaban con lo esperado se verificaron los niveles de expresión de los blancos directos del TCS Gac, que son los snc-RNAs del sistema Rsm. Su medición se realizó a partir de fusiones transcripcionales y medición del gen reportero *gusA*, que codifica para una β -glucuronidasa. La actividad del gen reportero *gusA* es directamente proporcional a la expresión del snc-RNA a medir. En tales ensayos la

expresión de los sn-RNAs mantenían la misma tendencia decreciente que la producción de alginato (Fig. 17) (Reyes Nicolau, 2018).

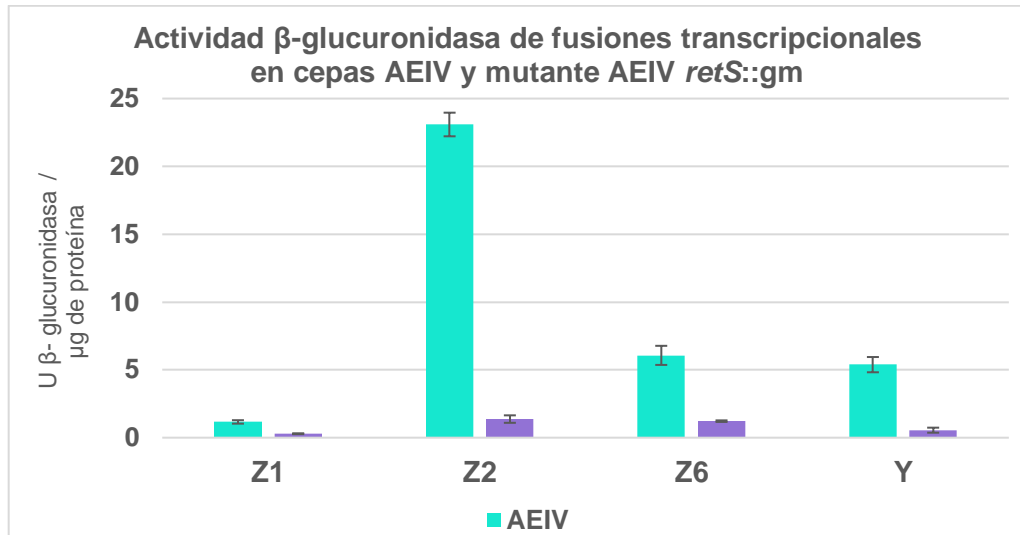


Fig. 17. Gráfica de cuantificación de actividad β-glucuronidasa de las fusiones transcripcionales de los snc-RNAs Z1, Z2, Z6 y Y (Reyes Nicolau, 2018).

1.2.3 Generación de una nueva mutante *retS*.

Después de que dos blancos del sistema TCS Gac se viesen disminuidos al mutarse *retS*. Se decidió comprobar la mutación a partir de generar una nueva mutante, ya que el fenotipo observado no concordaba con lo esperado. Esto a partir de la hipótesis de que el sitio donde se llevó a cabo la primera mutante *retS*, lo cual pudiese dar lugar a una proteína híbrida que tuviese una actividad residual. Razón por la cual las nuevas mutantes fueron generadas a partir de la inserción de un casete de resistencia a Kanamicina (km) en la secuencia que codifica al subdominio HATPasa, que es responsable de la actividad catalítica de la proteína (Figura. 6). Tal mutación fue realizada en dos orientaciones, convergente y divergente a la transcripción del gen *retS*. Esto con el fin de comprobar que no hubiese un efecto de polaridad sobre los genes río abajo. Dando como resultado a la mutante AEIV*retS::km* Polar y la mutante AEIV*retS::km* No Polar (Reyes Nicolau, 2018).

Tras confirmarse a las mutantes *AEIVretS::km*, se realizó la cuantificación de alginato. Se observó la misma tendencia de la primera mutante *AEIVretS::gm*, una disminución en su producción de alginato a niveles del control negativo, *AEIVgacA::gm* (Fig. 18). Aun así, se observó una pequeña diferencia en la cuantificación de las mutantes *AEIVretS::km*. Por el fenotipo similar entre ellas se decidió realizar los consecuentes ensayos de caracterización a partir de utilizar a la mutante *AEIVretS::km NP*. Posteriormente, se realizaron la medición de las fusiones transcripcionales de los snc-RNAs del sistema Rsm. Las que continuaban mostrando el mismo patrón decadente (Fig. 19) (Reyes Nicolau, 2018).

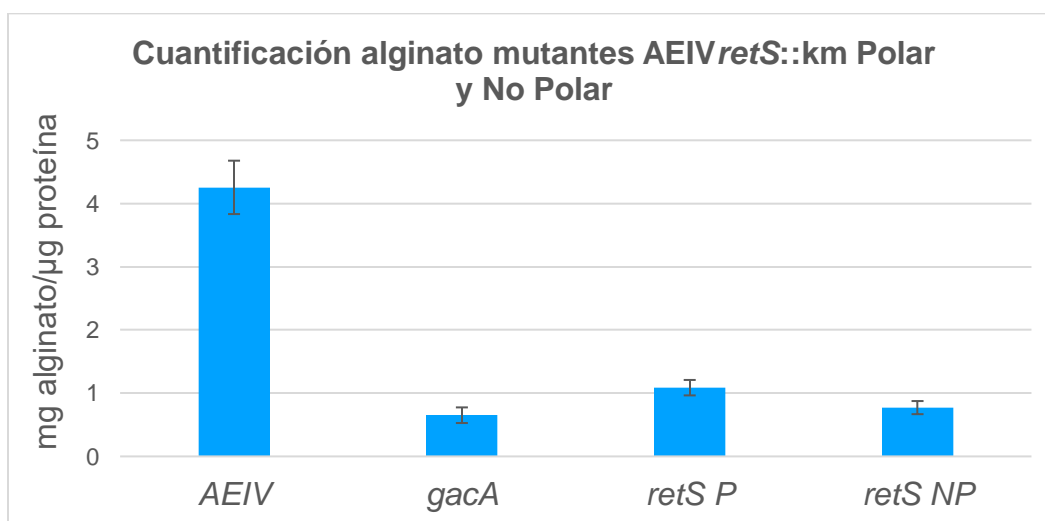


Fig. 18. Gráfica de cuantificación de alginatos de la cepa silvestre (WT), la mutante *AEIVgacA::gm*, *AEIVretS::km* y *AEIVretS::km NP* (Reyes Nicolau, 2018).

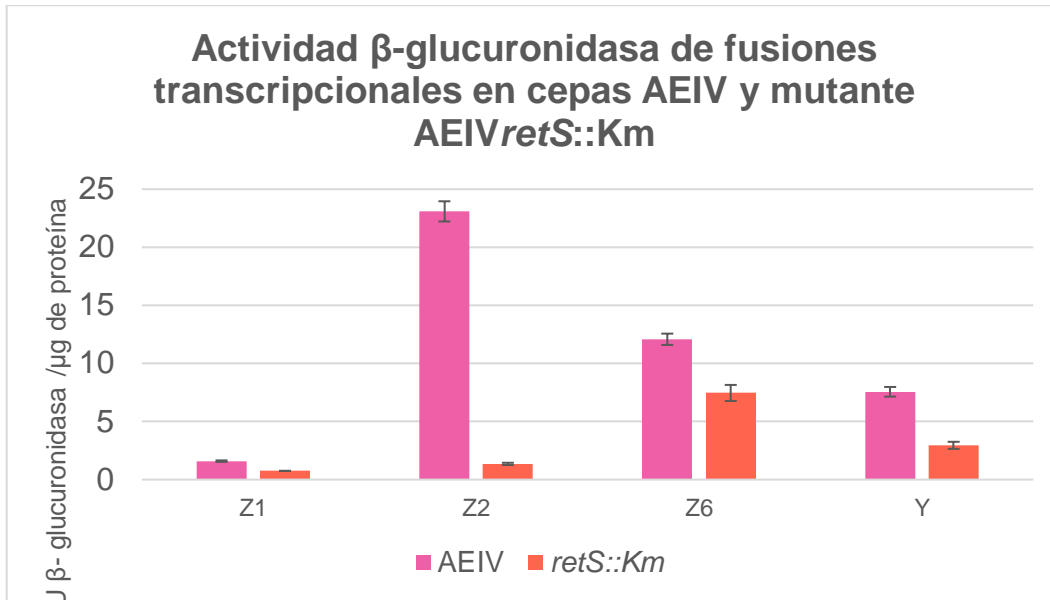


Fig. 19. Gráfica de cuantificación de las fusiones transcripcionales de los snc-RNAs del sistema Rsm. Donde se Muestran a las cepas con las fusiones transcripcionales Z1, Z2, Z6 y Y, de la WT y la mutante AEIVretS::km NP (Nicolau, 2018).

2.- Justificación.

El sistema de regulación Rsm controla la traducción de genes clave en la producción de alginatos. Este sistema regula al activador transcripcional del operón de las enzimas involucradas en la síntesis de alquilresorcinoles. Tal regulación es llevada a cabo a nivel postranscripcional y es estimulada por el TCS GacS/A. Determinar la función de la HK RetS nos permitirá comprender su papel en la red de regulación de los metabolitos secundarios de interés industrial.

3.- Planteamiento del problema.

Azotobacter vinelandii tiene una importancia en diversas industrias por su capacidad de producción de distintos metabolitos de interés industrial. Los alginatos sintetizados por esta bacteria pueden verse afectados en su composición a partir de modular la expresión de las proteínas involucradas en su regulación. Razón por la cual, entender el papel de las distintas proteínas involucradas en su síntesis permitirá avanzar en la meta de

obtener alginatos de peso molecular específico. De igual manera, la síntesis de alquilresorcinoles también tienen sistemas de regulación compartidos con las enzimas para la producción de alginatos. Aún siendo esto, los niveles jerárquicos de la red antepone al TCS Gac y otras HKs como los principales reguladores. Por lo cual, el determinar el papel de las proteínas involucradas en la regulación de GacS permitirá una comprensión global sobre la red de regulación.

4.- Hipótesis Científica.

La proteína RetS es regulador positivo de la producción de alginato y la expresión de los snc-RNAs del sistema GacS/A-Rsm.

5.- Objetivos.

5.1 Objetivo General.

- Determinar la función de RetS en la cascada de regulación GacS/A-Rsm.

5.2 Objetivos Específicos.

- Complementar a las mutantes AEIV*retS*::km.
- Sobreexpresar al gen *retS* en el fondo de la cepa silvestre AEIV.
- Determinar el efecto de la mutación, por inserción del casete de kanamicina, en las mutantes AEIV*retS* sobre los fenotipos alginatos y alquilresorcinoles.

6.- Resultados

6.1.- Complementar a las mutantes AEIV*retS*::km

Con el fin de dar evidencia de que el fenotipo observado en las mutantes AEIV*retS*::km es debido únicamente a la mutación de *retS*, se decidió complementarlas. Para ello se generaron dos estrategias, la complementación en *cis* y la complementación en *trans* (Fig. 20A.). Para la complementación en *cis* se utilizó el vector integrativo pUMA-tc, que posee un locus neutro de recombinación *meIA*. El resultado esperado era regresar una dosis génica en relación 1:1 respecto al alelo mutado y similar a la que existe en la WT. En el caso de la complementación en *trans*, se utilizó al vector pBBR1MCS-5. El cual es un plásmido movilizable de amplio rango de hospedero y de bajo número de copias (Kovach et al., 1995). Éste ha sido utilizado previamente en el fondo genético de *A. vinelandii* y presenta estabilidad en la bacteria.

Para lograr este objetivo, se amplificó al gen *retS* con su región reguladora por PCR. Se utilizaron a los oligonucleótidos ER1RR_RetS_Fw y RRetS-S1. Consecutivamente, por electroforesis en gel de agarosa, revelado con Bromuro de etidio (EtBr), se confirmó el amplicón esperado de 2948 bp (Fig. 20A). Después de ello, se realizó un protocolo de clonación para el vector pCR2.1-TOPO que fue transformado en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α . Se sembró en placas de medio LB con kanamicina, el antibiótico de selección. A partir de transformantes se extrajo el DNA plasmídico. La confirmación de la construcción se realizó por el perfil de restricción del plásmido.

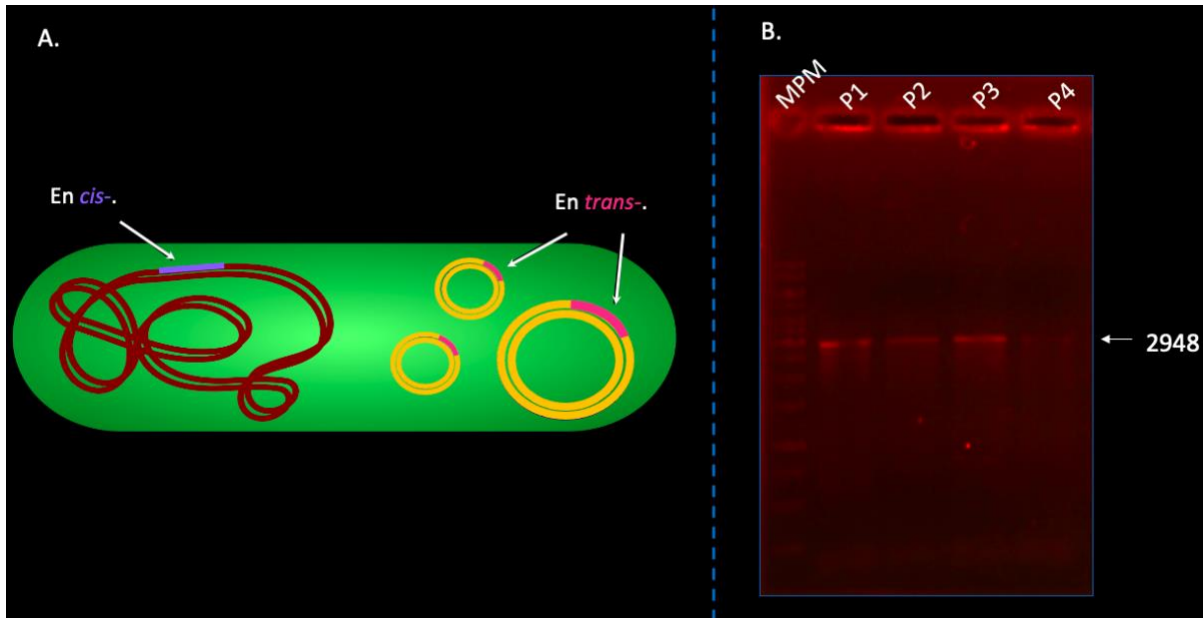


Fig. 20. A.) Representación gráfica de los dos tipos de complementaciones B.) Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de la PCR de la amplificación del gen *retS* con su región reguladora. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

Se utilizaron las enzimas *EcoRI*, *EcoRV*, *SalI* y *SacI* para confirmar la construcción. La restricción realizada con *EcoRI* tiene tres sitios de corte, produciendo tres fragmentos de tamaños 3913, 1583 y 1370 bp (Fig. 21A.). En la que la electroforesis mostró el perfil esperado (Fig. 22). En la segunda electroforesis, la primera es con *SacI*, tiene un sitio de reconocimiento, linearizando la construcción dando un fragmento de 6877 bp, a la derecha es una con *SalI*, que reconoce dos sitios del plásmido produciendo fragmentos de 4405 y 2472 bp; la tercera es una doble restricción con *EcoRI* y *SalI* con cinco sitios de corte (Fig. 21B.) dando fragmentos observables de 3931, 1571, 900 y 465 bp, dado que una banda no es visualizable en esta resolución y concentración del gel. Todas las bandas observadas correspondieron a los tamaños esperados (Fig. 22). La restricción con *EcoRV* fue realizada con el fin de determinar la orientación en la que fue clonado el amplicón (Figura 21C.). Las bandas obtenidas corresponden a los tamaños de 5969 y 908 bp (Fig. 22).

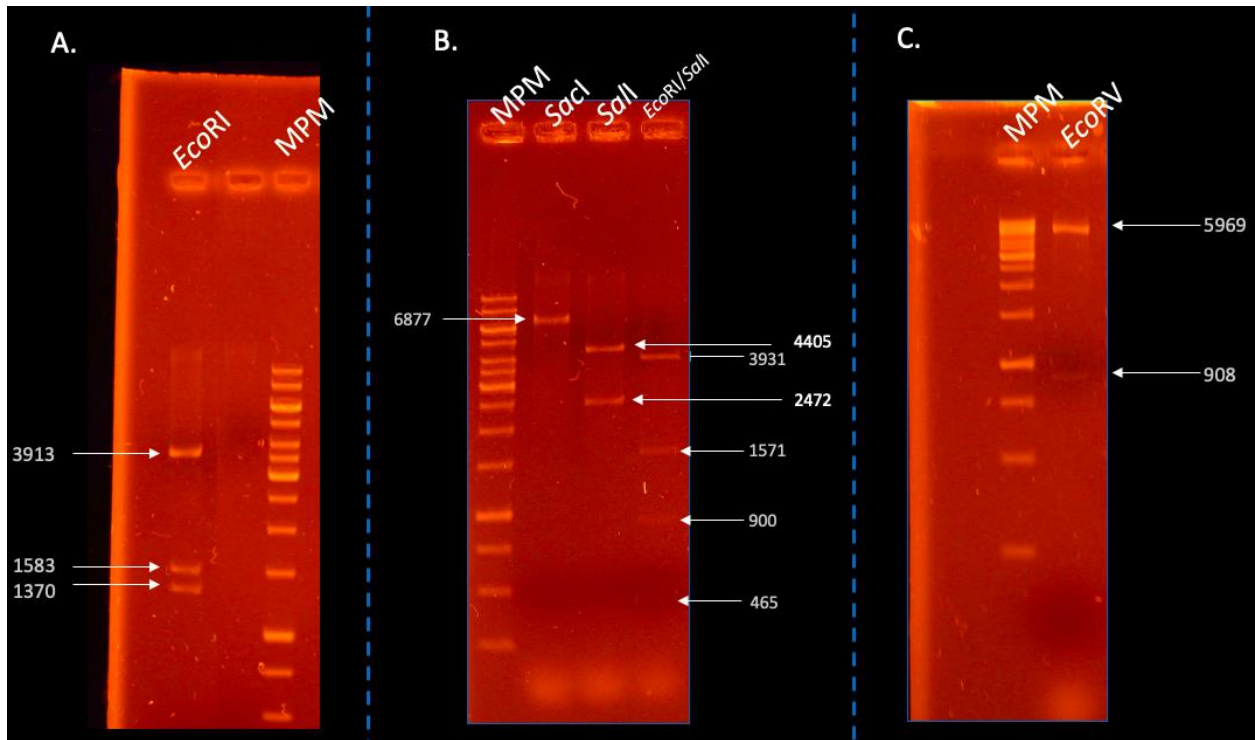


Fig. 21. Diferentes electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de restricciones para confirmar a la construcción pCR2.1-TOPO-*retS*. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

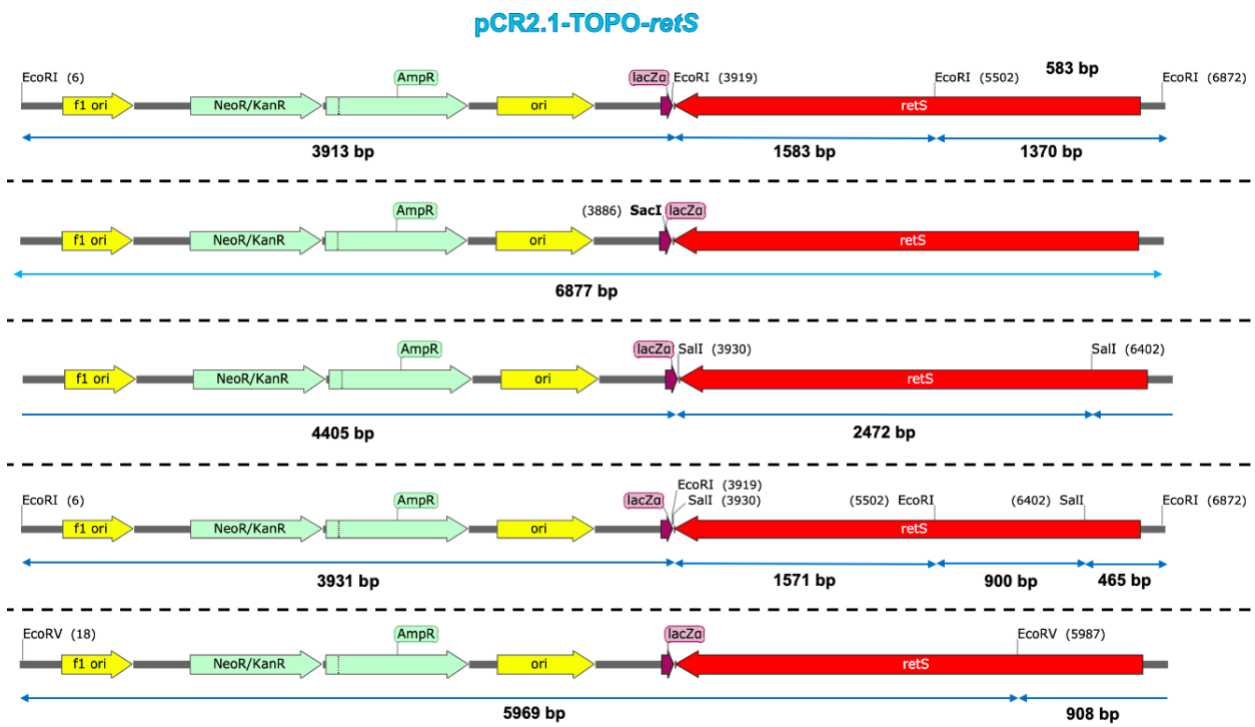


Fig. 22. Esquema de los tamaños esperados al tratarse al vector pCR2.1-TOPO-*retS* con distintas enzimas de restricción.

6.1.1.- Complementación en *trans*-.

Para subclonar a *retS* con su región reguladora en el plásmido se hizo una doble restricción con *XbaI* y *SacI*. Tal reacción fue realizada el fin de generar extremos compatibles entre el gen y el vector receptor linealizado. Consecuentemente, se realizó una purificación de banda de ambos fragmentos y se ligaron con T4 ligasa (Fig. 23). Después se siguió un protocolo de transformación para integrarlo al fondo genético de *E. coli* la cepa DH5- α que fue sembrada en placas de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido pBBR1CS-5.

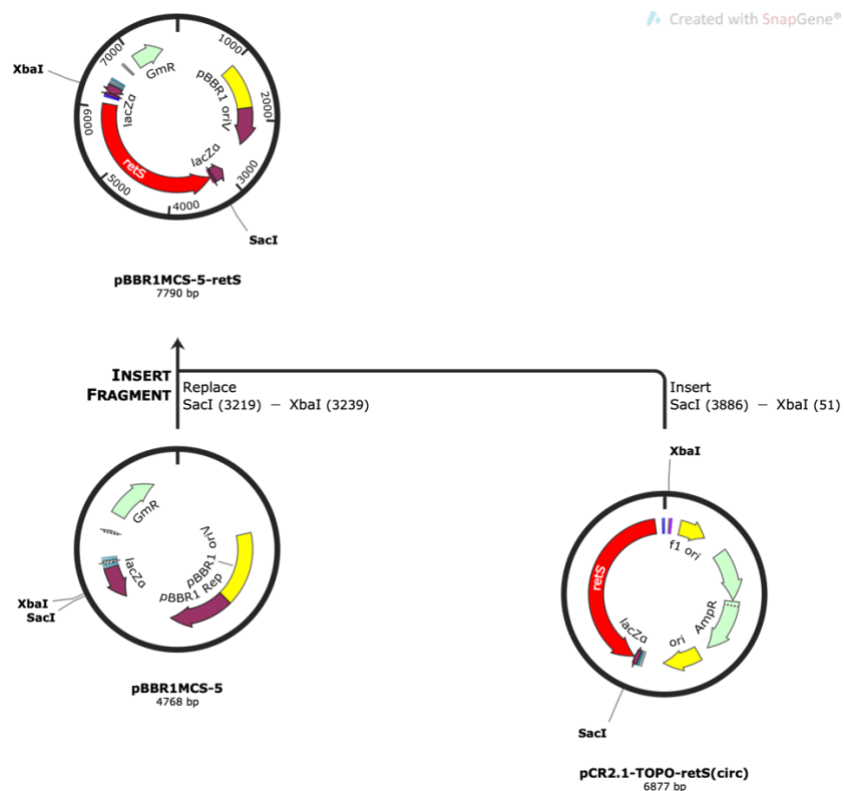


Fig. 23. Esquema del marco de trabajo para generar al vector pBBR1MCS-5-*retS*.

A transformantes se les extrajo DNA plasmídico y se realizó el perfil, para fin de confirmar la subclonación de *retS* más su región reguladora en el vector pBBR1MCS-5. Para ello, se realizaron restricciones con *SaII* y *SmaI*. La primera tiene tres sitios de corte, dando un patrón de tres bandas (Fig. 24) con tamaños de 4735, 2472 y 583 bp (Fig. 25). La

última tiene un sitio, linearizando la construcción, dando una banda de 7790 bp (Fig. 24). Donde los patrones de banda observado concuerdan con lo esperado (Fig. 25).

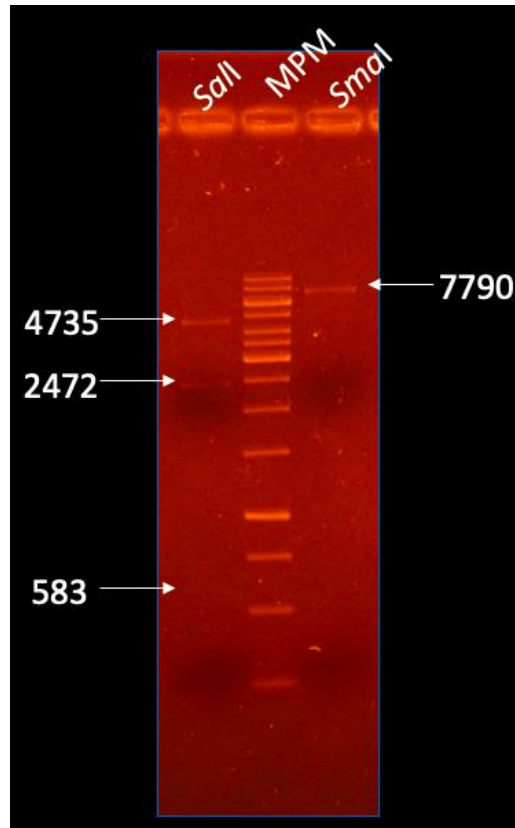


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de las restricciones realizadas para confirmar el vector pBBR1MCS-5-*retS*. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

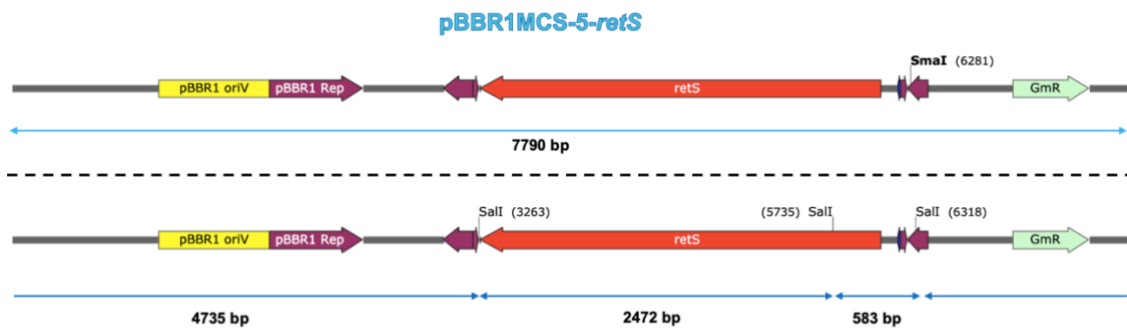


Fig. 25 Mapa del vector pBBR1MCS-5-*retS* y los tamaños esperados al tratarse con las enzimas de restricción.

La construcción pBBR1MCS-5-*retS* se transfirió a las mutantes *AEIVretS::km* con el fin de confirmar si restauraba el fenotipo de producción de alginato y síntesis de ARs. Se siguió un protocolo de conjugación para *A. vinelandii*. A transconjugantes en medio BS con el antibiótico de selección se les extrajo DNA genómico. Se amplificó al gen *retS* con los oligonucleótidos ER1RR_RetS_Fw y M13F23, generando un amplicón de 3064 bp para las candidatas a mutantes *AEIVretS::km* Polar y No Polar complementadas en *trans*. Para confirmar tal banda se realizó una electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, para checar si se obtenía el tamaño esperado. Donde las candidatas C1-3 de la Polar dieron positivo a tal amplicón (Fig. 26A), mientras que solo la C1 de la No Polar (Fig. 26B).

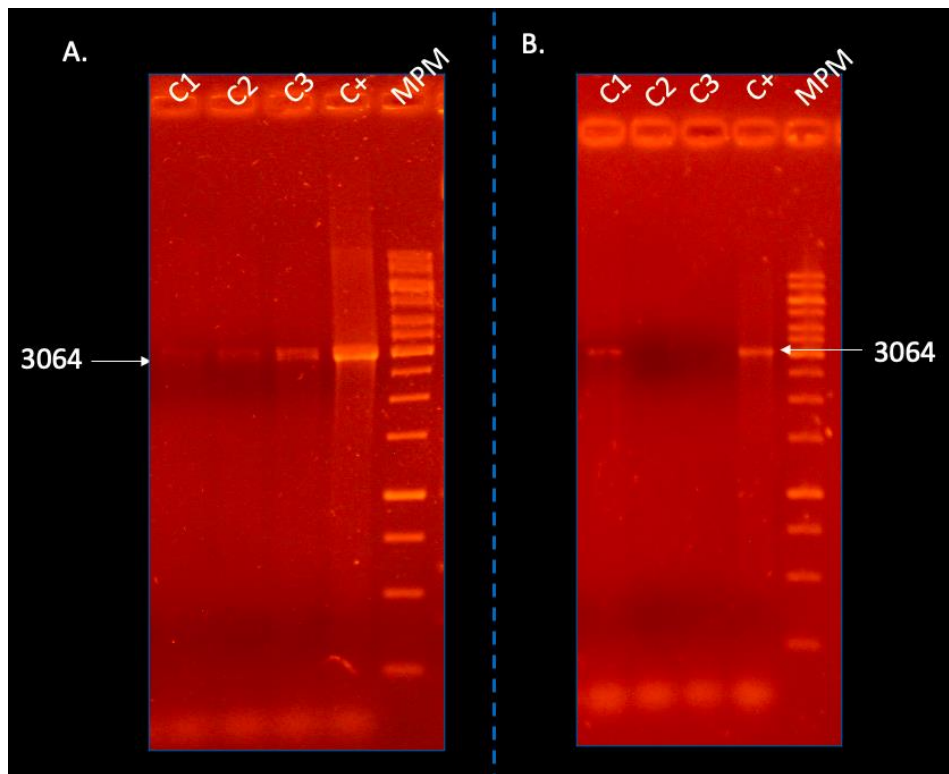


Fig. 26. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr, de la PCR para confirmar la presencia del alelo silvestre del vector pBBR1MCS-5-*retS* en las transconjugantes a ser A.) la mutante *AEIVretS::km* Polar y B.) No Polar complementadas en *trans*- Marcador de peso molecular de 1 Kb.

6.1.2.- Complementación en *cis*-.

La complementación en *cis* permite, además, de obtener una dosis génica similar a la WT, una mayor estabilidad. Para lograr la subclonación de siguió el siguiente esquema: se realizó una doble restricción con las enzimas *Xba*I y *Sac*I de la construcción pCR2.1-TOPO-*retS* y del vector pUMA-tc; los fragmentos purificados a partir de una electroforesis en gel de agarosa y ligaron con T4 ligasa (Fig.27); después se realizó un protocolo de transformación para integrarlo a la cepa de *E. coli* DH5- α y plaquearlo en placas LB, con el antibiótico de selección.

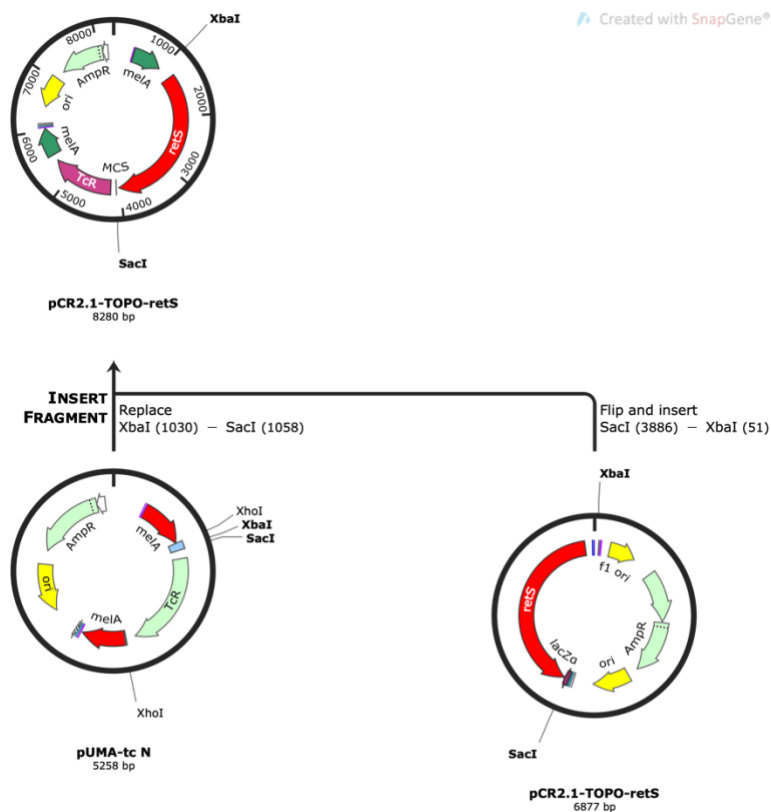


Fig. 27. Mapa de esquema de trabajo de cómo se generó al vector pUMA-tc-*retS*.

Una vez que se obtuvieron algunas colonias, se extrajo el DNA plasmídico para confirmar a la construcción pUMA-tc-*retS*, por su perfil de restricción. Se realizaron restricciones

con *EcoRI* y con *SmaI*. En el caso de la primera hay cinco sitios, pero al estar tres muy cercanos solamente se visualizan tres bandas (Fig. 28A.). Mientras que la última generaría un plásmido linealizado (Fig. 28B.). En la Fig. 29 se muestran los esquemas de los tamaños esperados al realizarse tales ensayos de restricción. En la primera las tres bandas más prominentes corresponderían a los tamaños de 5241, 1583 y 1370 bp. En el caso de la segunda reacción la banda obtenida sería del tamaño 8280 bp.

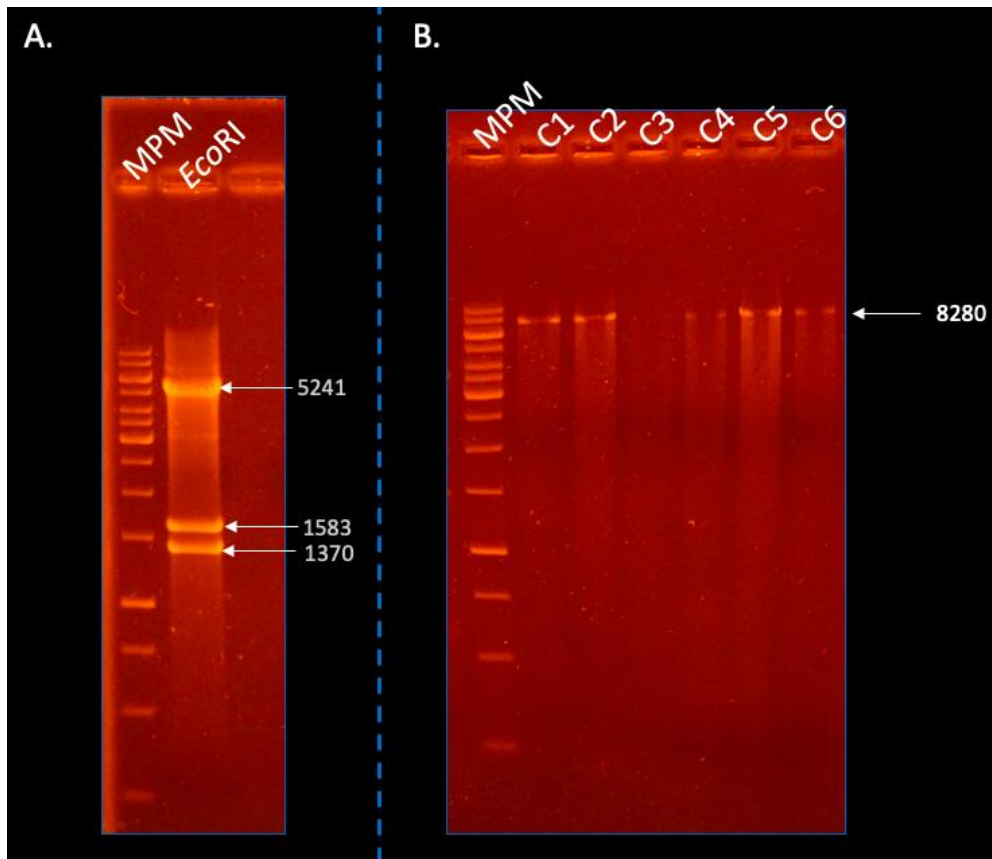


Fig. 28. Electroforesis en gel de agarosa, revelado con EtBr A.) de la restricción realizada con *EcoRI* y B.) la restricción con *SmaI* para confirmar a la construcción pUMA-tc-*retS*. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

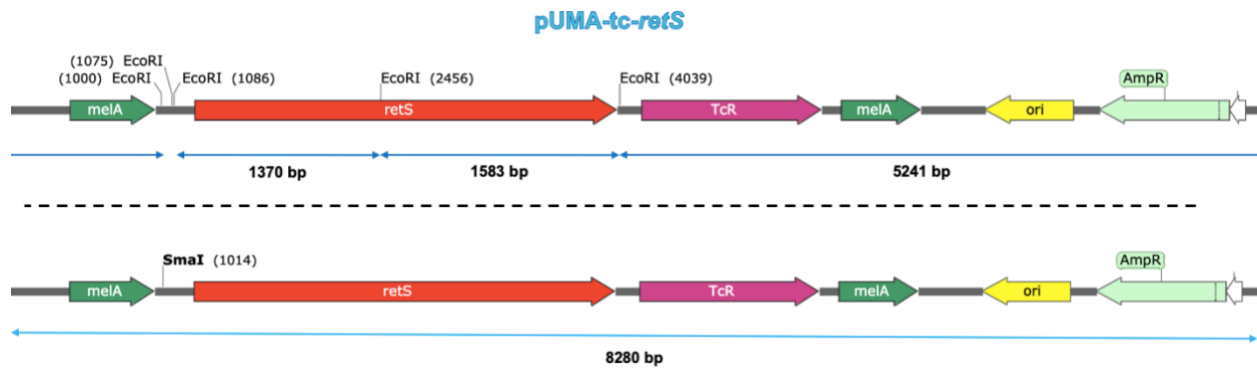


Fig. 29. Esquema de la construcción pUMA-tc-retS y los tamaños esperados al realizarse ensayos de restricción con distintas enzimas.

Una vez comprobada la construcción pUMA-tc-retS, se prosiguió a realizar un protocolo de transformación de *A. vinelandii*. Se aprovechó la capacidad de competente natural cuando es sembrada en un medio sin fuente de hierro, el medio CM. Sin embargo, con este protocolo no se logró recuperar ninguna transformante después de realizarlo en diversas ocasiones. Razón por la cual se decidió cambiar la estrategia. Inicialmente se transformó a la cepa silvestre AEIV con la construcción pUMA-tc-retS. Algunas colonias transformantes se comprobaron a partir de realizar una PCR con los oligonucleótidos ER1RR_RetS_Fw y TcFw, que produciría una banda de 3367 bp (Fig 30A). De éstas, se seleccionó una y se transformó con los vectores mutagénicos del gen *retS* con inserción de un casete de Kanamicina, construidos en un trabajo previo (Reyes Nicolau, 2018). Con algunas transformantes se corroboró la presencia de la segregación del alelo mutado con los oligonucleótidos ER1RR_RetS_Fw y Hsp70_RTIRv, que produjeron un amplicón de 3136 bp. (Fig. 30B). A partir de ello, se comprobó a las mutantes AEIVretS::km Polar y No Polar complementadas en *cis*. Cabe agregar, que en el caso de que no se segregue al alelo mutado se obtendría una banda 1808 bp.

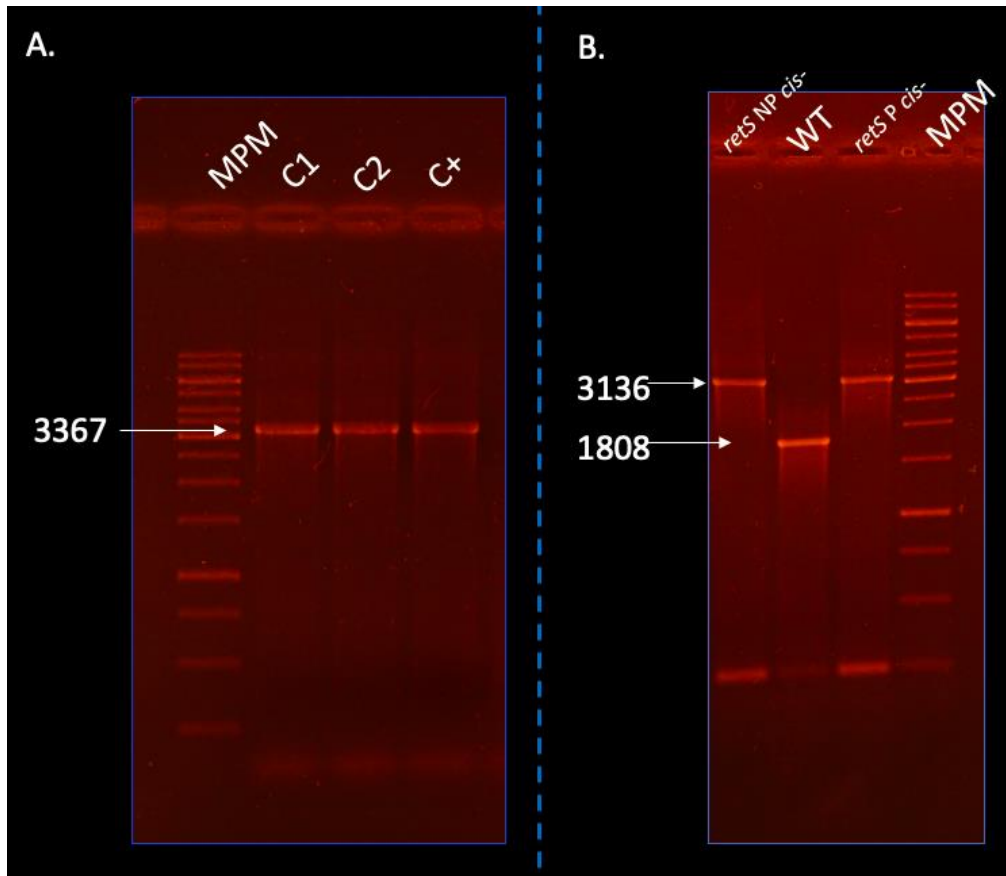


Fig. 30. Electroforesis realizada en gel de agarosa, revelada con EtBr de A.) de la PCR para confirmar a la cepa AEIVpUMA-tc-*retS* y B.) de las PCR para confirmar a las mutantes AEIV*retS*::km P y NP complementadas en *cis*-. Marcador de peso molecular de 1 Kb.

6.1.3.- Cuantificación de alginatos de la cepa AEIV*retS*::km NP complementada en *trans*.

Dado a que inicialmente se tuvieron las mutantes AEIV*retS*::km complementadas en *trans*, se decidió determinar la restauración de síntesis de alginatos. Se utilizó la mutante AEIV*retS*::km NP y sus derivadas para esta cuantificación. A través de las condiciones utilizadas para la cuantificación no mostraban una restauración de síntesis de alginatos. La cepa AEIV*retS*::km NP complementada en *trans*- mantenía el fenotipo a la cepa de la cual se derivó (Fig. 31). Aunado a ello ambas cepas mostraban un fenotipo similar al del control negativo, la mutante AEIV*gacA*::gm.

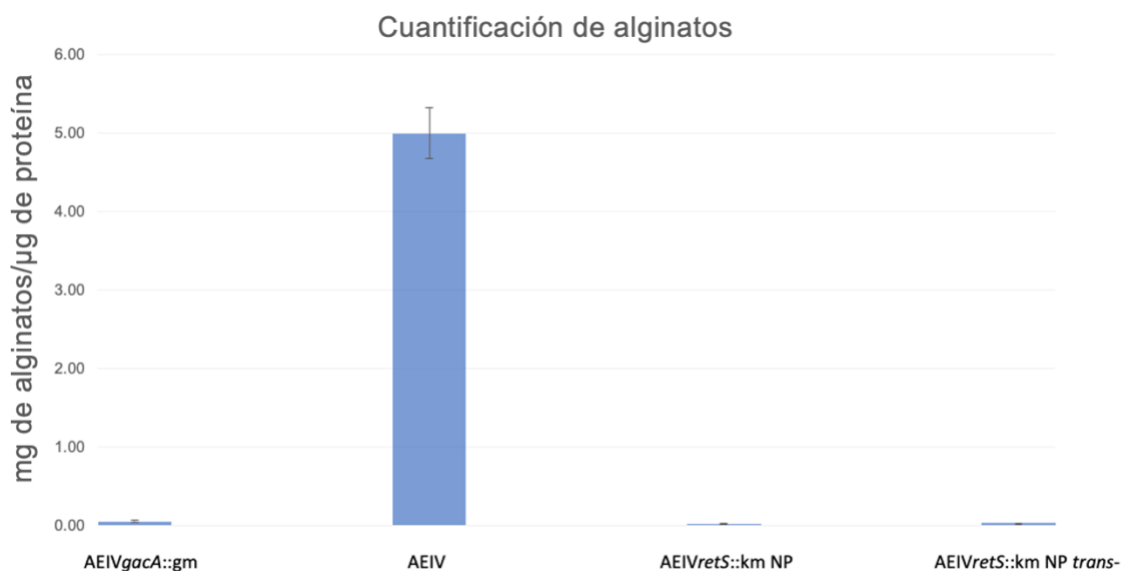


Fig. 31. Gráfica de cuantificación de alginatos de la complementada AEIVretS::km NP complementada en *trans*-.

6.1.4.- Ensayos de síntesis de alquilresorcinolos de las complementadas.

Una vez obtenidas las cepas AEIVretS::km complementadas, en *cis* y en *trans*, se realizó un ensayo cualitativo de síntesis de ARs. Esto con el fin de observar la posible restauración del fenotipo. Para realizar los ensayos las cepas fueron sembradas en medio BBOH (Burk *n*-Butanol), en el que se ha reportado al *n*-butanol como precursor del inductor del enquistamiento, que además es la fuente de carbono (Gama-Castro et al., 2001).

Previamente se reportó que los ARs forman azoderivados rojizos cuando son teñidos con sales de Fast Blue B (Tłuścik, Kazubek, & Mejbaum-Katzenellenbogen, 1981). Por lo que, a partir de este compuesto, se facilita la visualización de los fenotipos de las mutantes comparadas contra las complementadas. A partir de estos ensayos, los resultados obtenidos mostraban que la cepa AEIVretS::km NP complementada en *trans*-no restauraban la síntesis de ARs. La cepa mostraba una coloración similar a la mutante AEIVretS::km NP al igual que el control negativo, AEIVgacA::gm (Fig. 32A.). Por lo cual, mantenía concordancia con lo observado en la cuantificación de alginatos (Fig.31).

Asimismo, la cepa AEIV*retS*::km P complementada en *trans* tampoco restauraba la síntesis de ARs, dado que la tinción era similar a la cepa de la cual se derivó y el control negativo. En contraparte, la cepa AEIV*retS*::km NP complementada en *cis* sí mostraba una coloración rojiza, similar a la WT (Fig. 32C.), dando indicio de restauración de fenotipo. Aunado a ello, la cepa AEIV*retS*::km P complementada en *cis* mantenía esa tendencia y mostraba una tinción similar a la WT (Fig. 32D.). Por lo que daba evidencia de restauración de fenotipo. Curiosamente entre las mutantes AEIV*retS*::km había una diferencia en su coloración, siendo ligeramente superior en la mutante polar.

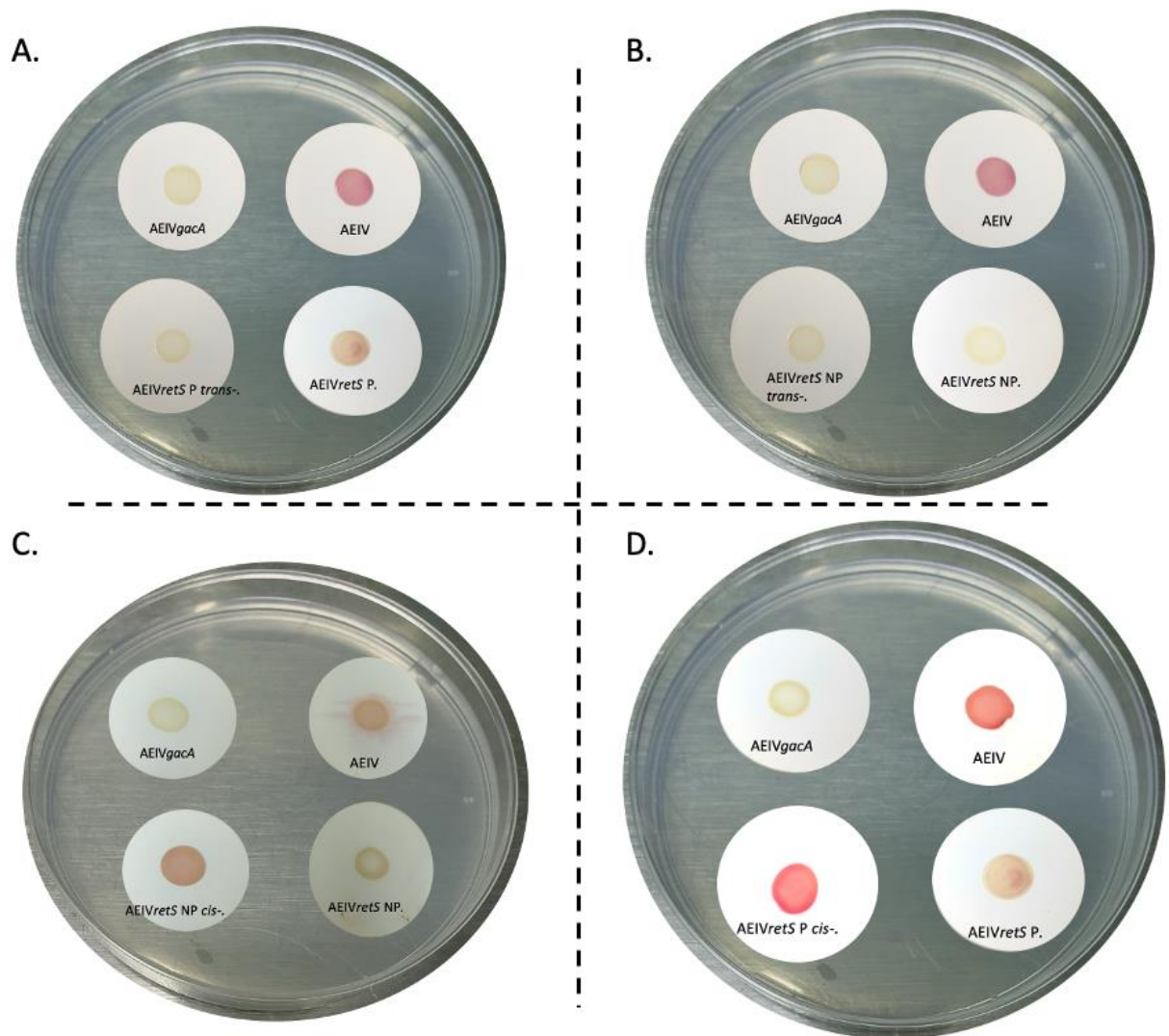


Fig. 32. Ensayos cualitativos de síntesis de alquilresorcinoles de: A.) de la mutante *AEIVretS::km P* complementada en *trans*-, B.) de la mutante *AEIVretS::km NP* complementada en *trans*-, C.) la mutante *AEIVretS::km NP* complementada en *cis*- y D.) de la mutante *AEIVretS::km P* complementada en *cis*-.

6.2.- Sobreexpresar al gen *retS* en el fondo de la cepa silvestre AEIV.

El estudio del papel de un gen puede realizarse a partir de la ganancia de función o con la pérdida de ella. Dado que ya se había realizado la mutación de *retS*, decidimos explorar el fenotipo de sobreexpresión en la WT. A partir de ello confirmar el papel que juega RetS en la síntesis de los alginatos y ARs. Siendo esperado que la sobreexpresión culminaría en un aumento en la producción de los metabolitos previamente mencionados

y en concordancia con lo previamente propuesto, de que RetS es un regulador positivo en *A. vinelandii*.

Para lograr el objetivo, se realizó un ensayo de conjugación para *A. vinelandii*, transfiriendo la construcción pBBR1MCS-5-*retS* a la WT, la cual fue utilizada para la complementación en *trans*. A partir de algunas transconjugantes se confirmó la presencia del plásmido por PCR, con los oligonucleótidos ER1RR_RetS_Fw y M13F23, siendo que el primero hibrida en la secuencia del gen *retS* y el segundo en una región conservada del plásmido, que generaron el amplicón esperado de 3064 bp. El fragmento esperado fue positivo de la candidata C2 -C5 (Fig. 33A.). Aun siendo esto, el fenotipo de las transconjugantes carecía de mucoidía.

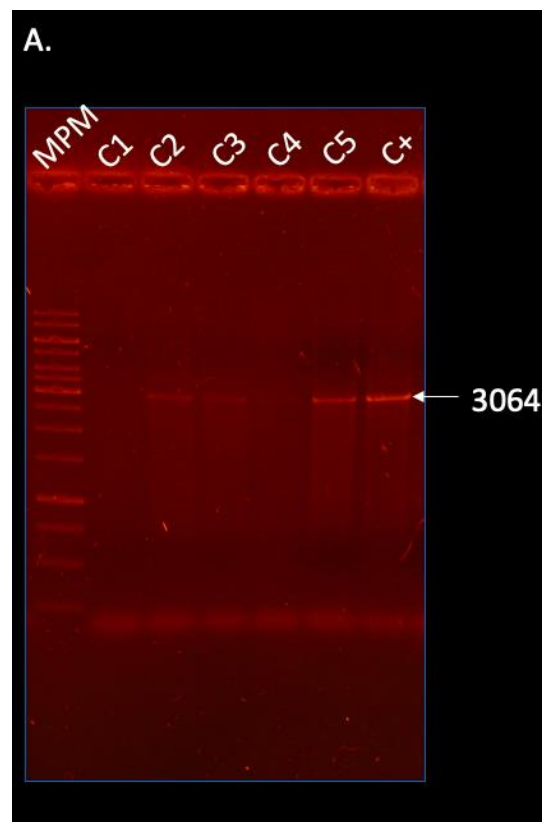


Fig. 33. Electroforesis en gel de agarosa, revelados con EtBr, de A.) las candidatas a ser la WT donde se sobrepresó a la WT (AEIV*retS*). Marcador de peso molecular de 1 Kb.

6.3.- Determinar el efecto de la mutación, por la inserción del casete de Kanamicina, en las mutantes AEIV*retS* sobre los fenotipos alginatos y alquilresorcinoles.

Como se mencionó previamente, las mutantes con la inserción del casete de resistencia, en sentido polar y no polar de AEIV*retS*, presentaban diferencias en la producción de alginatos. Razón por la cual, se decidió cuantificar nuevamente la producción del polímero. Estas diferencias también se observaron en la producción de otro metabolito secundario controlado por el TCS GacS/A, los ARs. En la que la mutante Polar, presenta una síntesis residual de ARs, mientras que la No Polar mostraba una abolición de éstos (Fig. 34A.).

Se cuantificaron los alginatos en las cepas mutantes. Sin embargo, nos dimos cuenta que las cepas Polar y No Polar presentaban producción de alginatos cuando se sembraban directamente del glicerol, pero cuando se sembraban varias veces en medio Burk Sacarosa perdían la capacidad de producir el polímero. Presentando un fenotipo similar al encontrado en la cepa mutante en el gen *gacA*, que es el regulador de respuesta del sistema involucrado en su regulación. Al fenotipo que producía alginatos se le llamó “blanco” porque ese es el color que presentaban las colonias, mientras que al fenotipo no productor de alginato, se le denominó “café”, dado que ese era el color de las colonias cuando no producían alginatos (Fig. 34B).

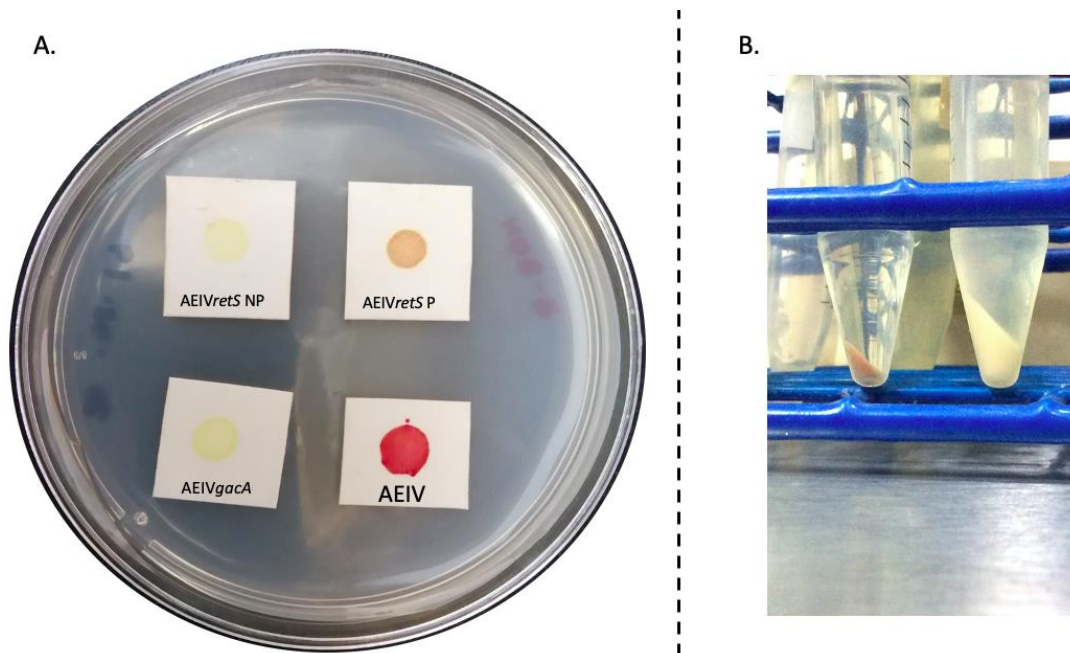


Fig. 34. A.) Ensayo cualitativo de síntesis de alquilresorcinolos de las mutantes *AEIVretS::km P* y *NP*. B.) Tubos de ensayo de cultivos centrifugados de la mutante *AEIVretS::km NP* en ambos estadios.

Para realizar la cuantificación se decidió escoger a la cepa que había sido utilizada mayoritariamente en este trabajo y en el previo, la mutante *AEIVretS::km NP*. Una vez realizada la cuantificación de alginatos, se mostraba relación de la síntesis dependiente de su estadio. En la cual en el fenotipo blanco era clara la presencia del metabolito y la cuantificación mostraba una síntesis similar al de la WT. En contraparte, en el café había una abolición de su producción y el fenotipo era similar al control negativo, la mutante *AEIVgacA::gm* (Fig. 35).

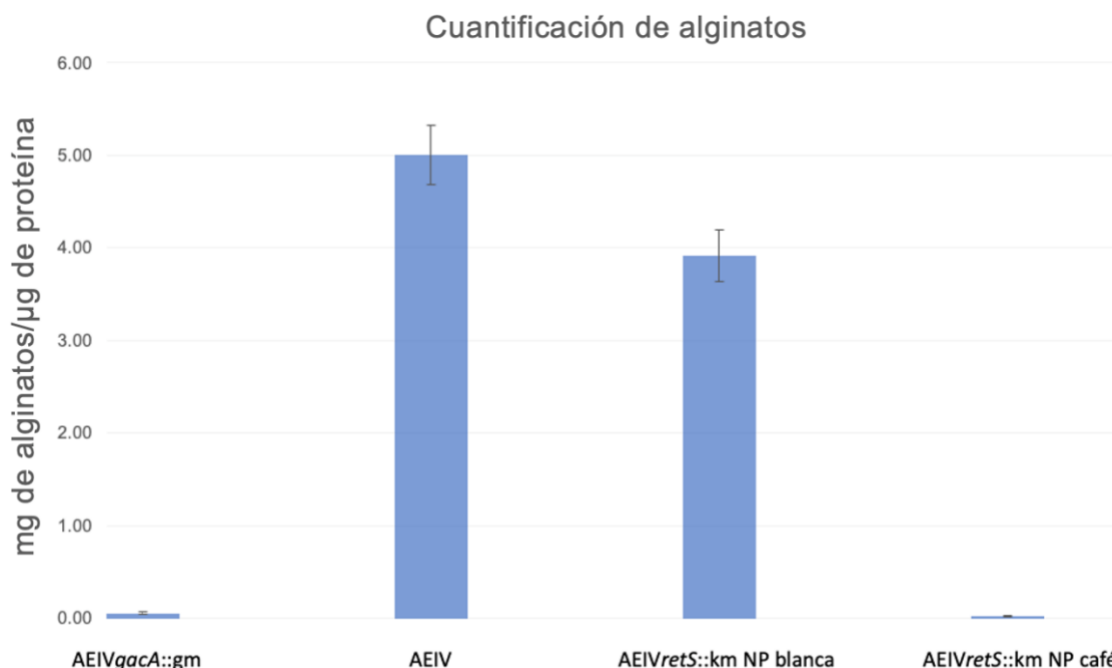


Fig. 35. Gráfica de cuantificación de alginatos de las mutantes AEIVretS::km NP en ambos estadios (blanco/mucoide y café/no mucoide).

Al observarse que los estadios afectaban de manera significativa la síntesis de alginatos, se decidió verificar si había un efecto sobre los alquiresorcinoles, otro de los metabolitos secundarios controlados por el sistema GacS/A. Por ello los ensayos se ampliaron a la mutante AEIVretS::km P, en ambos fenotipos. Se realizaron ensayos cualitativos con sales de Fast Blue B para la detección de ARs en las cepas AEIVretS::km P y NP en ambos estadios, productores y no productores de alginatos.

En los ensayos cualitativos de ARs se mostró una tendencia similar a la cuantificación de los alginatos en la cepa AEIVretS::km NP. El fenotipo mucoide presentaba una coloración rojiza por la producción de ARs. En contraparte el fenotipo no productor de alginatos no presenta la producción de éstos (Fig. 36A). Asimismo, los fenotipos observados en la mutante AEIVretS::km P, en ambos estadios, mantenían ese comportamiento (Fig. 36B).

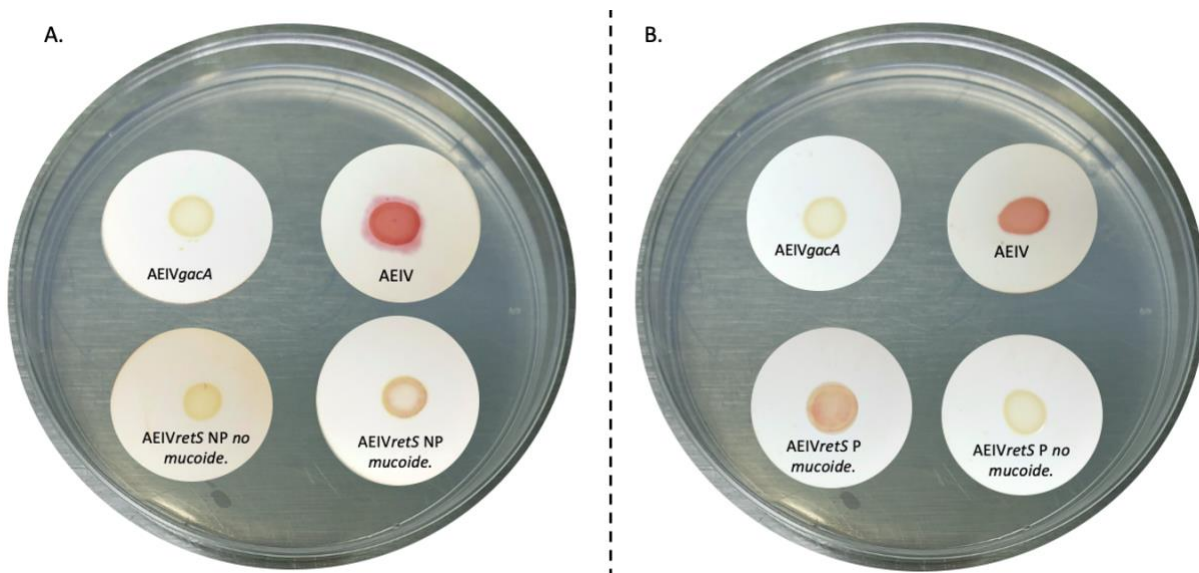


Fig. 36. Ensayos cualitativos de síntesis de alquilresorcinoles de las mutantes AEIVretS::km. En la placa A.) se encuentra el ensayo de la mutante AEIVretS::km NP mucoide/blanco y no mucoide/café. Mientras que en la placa B.) la mutante AEIVretS::km P en sus estadios mucoide/blanco y no mucoide/café.

7.- Discusión.

7.1.- Complementación de las mutantes AEIVretS::km.

En un trabajo previo se había reportado que la mutación de *retS* afectaba negativamente la síntesis de alginatos y ARs en *A. vinelandii*. Ésto era opuesto a lo reportado en *P. aeruginosa*, en la cual RetS actúa como un represor de los fenotipos regulados por el sistema GacS/A. Tal efecto ha sido reportado en otras especies del género *Pseudomonas* (Records & Gross, 2010; Zhang et al., 2015), razón por la cual, la generación de las cepas complementadas permitiría dar sustento al papel propuesto de regulador positivo de la HK en la cascada Gac/Rsm.

Se decidió realizar la complementación en *trans*, por la facilidad que se tiene de obtener colonias que portarán plásmidos con el gen *retS* más su región reguladora. Al obtener dichas cepas, se realizó la medición de la producción de alginatos y la observación de la producción de alquilresorcinoles, concluyendo que la complementación en *trans* no había

restaurado el fenotipo. Una posible explicación a la falta de restauración del fenotipo podría radicar en la naturaleza de las HKs. Las cuales llegan a poseer una actividad dual, de cinasa y de fosfatasa. La transición entre sus actividades no se ha comprendido del todo, aunque algunas HKs puede actuar con dicha actividad en la ausencia del estímulo (Igo, Ninfa, Stock, & Silhavy, 1989). Aunado a ello, el efecto que ejercen las HKs ha sido ampliamente estudiada sobre su RR cognado. Además, en algunos TCSs existe relación entre el aumento de la concentración de la HK con un favorecimiento de la defosforilación de su RR (Georgellis, Kwon, De Wulf, & Lin, 1998; Kenney, 2010). Por lo cual, sería importante cuantificar el aumento de la HK en la complementación en *trans*. Dado que sí la concentración aumentará de manera significativa y fuera mayor al fondo silvestre, tal dosis pudiera favorecer la actividad fosfatasa de esta proteína. En la cual, se puede promover un mecanismo similar a los propuestos de la interacción entre GacS-RetS en *P. aeruginosa* (Francis et al., 2018). Asimismo, sería importante cuantificar la dosis génica que se aumenta en la complementación en *trans*, aun siendo que los plásmidos pBBR1MCS son de bajo número de copias.

Otra posibilidad es que tanto la presencia en una alta concentración, como solo el fondo genético *retS*⁻ reprimen la síntesis de alginatos y ARs. Ya sea al promover una actividad negativa en su sobreexpresión, como una nula expresión en tal mutante, en fenotipo café/ no mucoide. Por lo cual es importante determinar si las cepas de la cuantificación mantienen tal construcción y en todo caso que lo mantenga, en cuanto aumenta la concentración del mensajero de *retS* y de RetS.

Por lo anterior, se decidió realizar la complementación en *cis*. Las cepas esperadas no se lograron obtener a partir de la transferencia del material genético por transformación natural de las cepas AEIV*retS*::km P y NP. Esto puede ser debido a que el fenotipo de las mutantes AEIV*retS*::km es muy parecido al observado en la cepa AEIV*gacA*::gm, donde se han realizado ensayos de proteómica (Datos no publicados). En éstos se ha observado disminución en la expresión de los sistemas de competencia. Por consiguiente, dado a la similitud de los fenotipos entre las cepas es posible que la expresión de aquel sistema se vea afectado, en el fondo genético de las mutantes AEIV*retS*::km.

Al no ser posible la obtención de cepas complementadas en *cis* por transformación natural, se decidió realizar la transformación de la cepa silvestre con el vector pUMA-tc-*retS* y posteriormente generar la mutación del gen *retS*. Con ello evadir la dificultad de transformación en un fondo genético *retS*⁻, del que no se recuperaron transformantes. A partir de esta estrategia fue posible la obtención de cepas complementadas en *cis*. El fenotipo de la producción de ARs fue restaurado en ambas mutantes AEIV*retS*::km P y NP, con lo que pudmos comprobar que la HK RetS tiene un papel de regulador positivo en la cascada de regulación Gac/Rsm. Comprobando por tanto, un papel opuesto a lo que se ha reportado en algunos homólogos de RetS en las *Pseudomonas*, en la que la HK regula negativamente a los blancos del TCS GacS/GacA. Ejemplos de ello en *P. aeruginosa* y, también, en *P. syringae*, en las que RetS regula negativamente la movilidad (Moscoso, Mikkelsen, Heeb, Williams, & Filloux, 2011; Records & Gross, 2010). En contraparte, en *P. protegens* se ha reportado algo similar a lo observado en *A. vinelandii*, ya que la mutación de *retS* no afecta de la manera esperada y promueve la movilidad (Ueda, Ogasawara, & Horiuchi, 2020).

7.2.- Sobreexpresión del gen *retS* en el fondo de la cepa silvestre AEIV.

La mutación de *retS* apuntaba a que este gen codificaba para una proteína que fungía como regulador positivo de la cascada Gac/Rsm. Por lo cual, se propuso que la sobreexpresión promovería una mayor síntesis de alginatos. Sin embargo el fenotipo no concordaba con lo esperado, dado que mostraba un fenotipo similar a las mutantes AEIV*retS*::km. Lo cual, a su vez, no permitía esclarecer que fenotipo se obtenía al sobreexpresar a *retS*.

Las mutantes AEIV*retS*::km complementadas en *trans* no restauraban la síntesis de alginatos, de igual manera que la síntesis de ARs. Esto podría concordar con el fenotipo observado en la cepa sobreexpresada, AEIV*retS*. De igual manera en un trabajo previo se sobreexpresó al gen *gacS* en *trans* el fondo de *A. vinelandii* y el fenotipo observado era no mucoide, lo cual no concordaba con lo esperado al sobreexpresar a dicho gen (Datos

no publicados). Una forma de explorar si la sobreexpresión causa un efecto contrario puede realizarse a partir de generar una nueva cepa donde se sobreexpresa a *retS* y documentar si ésta concuerda con lo observado en la cepa sobexpresada inicial. En caso de obtención un fenotipo diferente a la primera, abriría la interrogante de qué promueve tal disparidad. En la que determinar los niveles de la construcción y de *retS* en el fondo genético WT podría permitir esclarecer la diferencia, que pudiese ser mediada por la dosis génica, en dado caso. Mientras que un resultado similar a AEIV*retS* daría evidencia de que ese es el fenotipo al sobreexpresar a *retS*. Aunado a ello, partiendo de que se mantenga el fenotipo inicial, se tendría que replantear la determinación del papel de esta HK mediante su sobreexpresión. Siendo que se adjudicaría un papel a partir de los metabolitos cuantificados, por esta vía, y podría ser desacertado. Dado que, al promoverse una actividad al sobreexpresarse, la cual realiza, en menor incidencia, en la concentración nativa que afectaría el fenotipo generado.

Otro punto a considerar es la forma en la cual se lleva a cabo la sobreexpresión, en *trans*. En trabajos realizados con *gacS* de *A. vinelandii* se documenta que el fenotipo esperado se obtiene pero al realizarse la sobreexpresión en *cis* (Datos no publicados). Una forma de explicarlo es a partir de la dosis génica que se aumenta en la cepa, siendo al agregar una copia más si se realiza con su región reguladora, mientras que la de *trans* depende de las copias del vector. Aunque siendo esto, se debe checar si el fenotipo es obtenido al realizarse con *retS* y en caso de utilizarse una región promotora que aumente considerablemente su expresión éste se mantenga. Por lo cual una alternativa para realizar la sobreexpresión puede ser a partir de seguir una estrategia en *cis*.

7.3.- Determinación del efecto de la mutación, por la inserción del casete de Kanamicina, en las mutantes AEIV*retS* sobre los fenotipos alginatos y alquilresorcinoles.

Se decidió volver a realizar la cuantificación de alginatos de las mutantes AEIV*retS*::km P y NP, dado que había una diferencia en sus síntesis y determinar si era significativa. Las cepas procedentes del glicerol mostraban un fenotipo mucoide, el cual era distinto al

de las cepas que ya habían recibido un cierto número de pases. Por lo que, al ser fenotipos claramente distintos se exploró si tal cambio afectaba la síntesis de alginatos y ARs.

La mucoidía en *A. vinelandii* está directamente asociada a la síntesis de alginatos. Razón por la que era altamente probable que el cambio fenotípico afectara de manera sustancial la síntesis del polímero. La cuantificación mostraba que la mutante AEIV*retS*::km NP en el estadio blanco/mucoide sintetizaba una concentración similar de alginatos a la cepa silvestre. En contraparte, en el estadio alternativo, no mucoide, carecía de una síntesis de alginato, similar al control negativo, la mutante AEIV*gacA*::gm. El ensayo se generó en la mutante no polar, principalmente para descartar algún efecto de polaridad sobre genes que estuvieran río abajo del gen *retS*.

Una vez establecido que el cambio fenotípico alteraba la síntesis de alginatos, se decidió explorar otro metabolito regulado por la vía, los ARs. Los resultados obtenidos mostraron que en el estadio blanco/mucoide había producción de ARs y los resultados se conservaban en ambas mutantes AEIV*retS*::km P y NP. En contraparte, cuando las cepas estudiadas presentaban el fenotipo no mucoide/café, no producían los metabolitos, alginatos ni de los ARs. Interesantemente en este ensayo, la mutante AEIV*retS*::km P café/no mucoide no mostró síntesis, similar a la AEIV*retS*::km NP en tal estadio. Por lo que, se podría suponer que haya más de dos fenotipos generados en el fondo genético *retS*, ya sean fenotipos intermedios o varias subpoblaciones fenotípicas.

En la bibliografía no se obtuvieron resultados de un reporte de cambio fenotípico en *A. vinelandii*, por lo cual se decidió ampliar la búsqueda. Existen varios reportes en el género más cercano, las *Pseudomonas*, apuntaban a la **variación de fase** como posible respuesta a tal fenómeno de cambio fenotípico (Deretic & Konyecsni, 1990; Lalaouna et al., 2012; Sánchez-Contreras et al., 2002; A. Segura, Hurtado, Duque, & Ramos, 2004; Vafina & Stupak, 2020; van den Broek, Chin-A-Woeng, Bloemberg, & Lugtenberg, 2005a). Éste, es un proceso que controla los cambios en la expresión de genes de fase variable. Los cuales en sus estadios apagado y encendido permiten cambios discretos, en una misma población clonal, generando poblaciones con heterogeneidad fenotípica.

Tal proceso aumenta la plasticidad génica a través de la generación de subpoblaciones. Por ende, aumenta la probabilidad de sobrevivencia ante cambios transitorios en el ambiente. Mientras que de aquellas que se sobrepongan a los estímulos pueden diferenciarse y generar nuevas poblaciones heterogéneas, cuando el estímulo cesa. Por lo tanto, la variación de fase es un proceso reversible. En la cual, la frecuencia de cambio de los estadios de los genes está relacionado con los estímulos del ambiente (Phillips, Tram, Seib, & Atack, 2019; Trzilova & Tamayo, 2021; van der Woude, 2011).

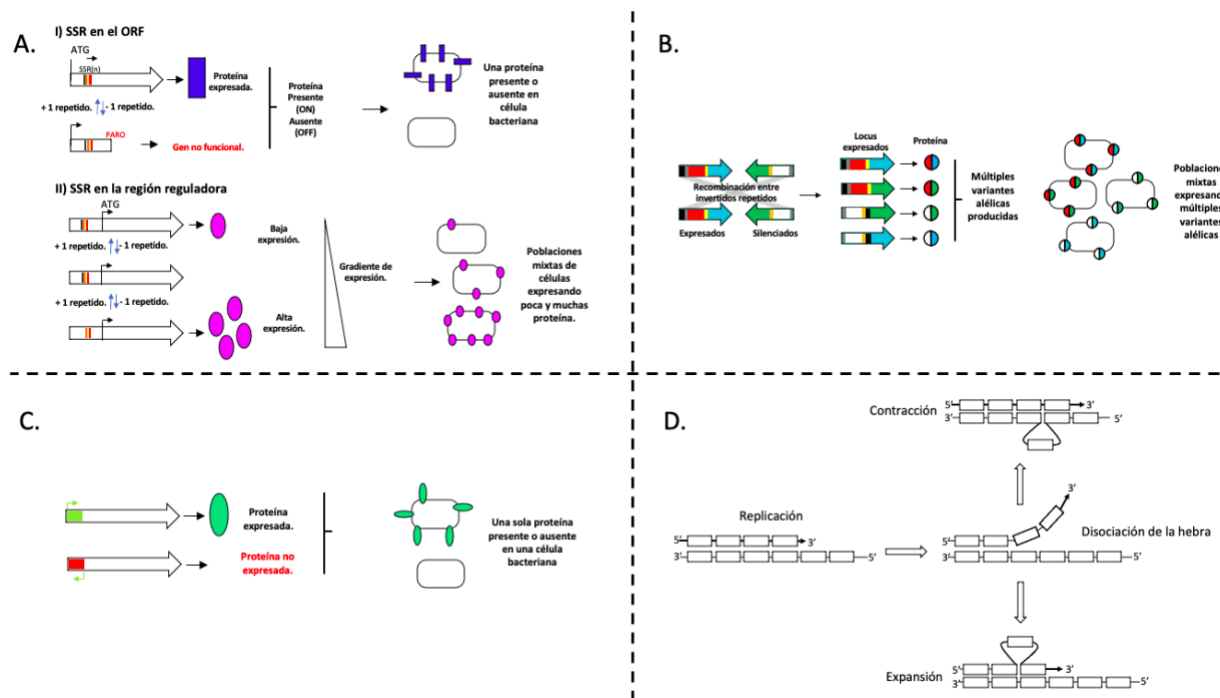


Fig. 37. Esquema de los mecanismos genéticos involucrados en la variación de fase. A.) Emparejamiento erróneo de hebras deslizadas. B.) Recombinación homóloga. C.) Recombinación conservada de DNA sitio específico. D. Descripción de cómo se lleva a cabo el emparejamiento erróneo de hebras deslizadas, durante la replicación. Modificado de (Hansson et. al, 2018; Phillips, Tram, Seib & Atack, 2019).

Los mecanismos por los cuales se rige la variación de fase se dividen en genéticos y epigenéticos. Los primeros pueden ser subdivididos en emparejamiento erróneo de hebras deslizadas, en recombinación homóloga y recombinación conservada de DNA sitio específico (Fig. 37). Mientras que los epigenéticos están asociados a

metiltransferasas y los sistemas de restricción y modificación (R/M). Ellos median la metilación del material genético, modificando características como la distinción del propio, la afinidad de proteínas a ciertas secuencias, entre otras (Marinus & Casadesus, 2009; Sánchez-Romero & Casadesús, 2020; Trzilova & Tamayo, 2021).

De los sistemas R/M se han descrito cuatro tipos principales (Phillips, Husna, Jennings, Seib, & Atack, 2019). Un sistema R/M típicamente consiste en dos integrantes, una DNA metiltransferasa (M) y endonucleasa de restricción cognada (R). De igual manera, los sistemas R/M tipo I y III pueden ser regulados por los mecanismos genéticos, lo cual da lugar al *phasevarion* o regulón de fase variable (Atack, Guo, Yang, Zhou, & Jennings, 2020; Srikhanta, Maguire, Stacey, Grimmond, & Jennings, 2005). Por lo tanto tal forma de regulación modifica los patrones de metilación sobre ciertos segmentos del genoma dependiendo de la expresión de estos sistemas.

En las *Pseudomonas* se ha reportado que uno de los blancos de la variación de fase son los genes que codifican para el TCS GacS/GacA. Dentro de los mecanismos descritos se encuentran al emparejamiento erróneo de hebras deslizadas (van den Broek et al., 2005). Este mecanismo está asociado a los trectos de secuencia repetida simple (SSR, *simple sequence repeats*). Los cuales pueden dar lugar a inserciones y deleciones, que puedan generar un corrimiento del marco de lectura abierto (ORF), cuando sucede la replicación. De igual manera, tales SSR pueden localizarse en la región reguladora y afectar las secuencias reconocidas por ciertas proteínas (Moxon, Bayliss, & Hood, 2006; Phillips, Tram, et al., 2019; van der Woude, 2011). Aunado a ello, también existen reportes de inversiones dentro del ORF de los genes *gac* (van den Broek et al., 2005), la cual puede generar un codón de paro prematuro, que genere proteínas truncas o que el ORF no codifique para tal proteína. En *P. fluorescens* se ha asociado a las recombinasas sitio específico SSS y XerD a este proceso (Martínez-Granero, Capdevila, Sánchez-Contreras, Martín, & Rivilla, 2005; Sánchez-Contreras et al., 2002).

En *A. vinelandii* el TCS GacS/GacA es esencial para la síntesis de alginatos y ARs. La mutación de los genes, que codifican para este sistema, abaten la producción de los metabolitos mencionados. Además, las mutantes AEIV*retS*::km en el estadio café/no

mucoide son similares a las mutantes *gacS*⁻ y *gacA*⁻ en los fenotipos abolidos. Asimismo, este fenotipo no es inicial en el fondo genético *retS*⁻. Por lo cual, una posibilidad a ello es que suceda un fenómeno de variación de fase, en las mutantes AEIV*retS*::km, que promuevan el cambio fenotípico. El la que el fenotipo alternativo pueda deberse a más de una mutación y uno de los posibles blancos serían los genes del TCS GacS/GacA. A partir de ello, se podría explicar la súbita depleción de los metabolitos en las mutantes AEIV*retS*::km. A través de alineamientos de los dominios transmisores de las HKs RetS de *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* muestran una conservación de la caja degenerada G, la cual es requerida para la unión de ATP. La similitud entre ellas dificulta el entendimiento del papel de regulador positivo propuesto. Aunado a ello, a través de los mismos se verificó la HKs RetS de *P. protegens* Pf-5 y *A. vinelandii*, en la que se ha reportado que la mutación de la primera no afecta de la manera esperada en este fondo genético y apunta a un rol distinto a la de *P. aeruginosa* (Ueda et al., 2020). Aun así, ambas muestran una conservación de la secuencia del transmisor y degenerada la caja G (Fig. 38). Por lo cual, a partir de ello no se puede explicar cómo es posible que los blancos alterados son opuestos entre la de las *Pseudomonas*. Asimismo, tampoco se apoya el papel de regulador positivo propuesto de la HK RetS de *A. vinelandii*. Por lo tanto, determinar que influencia la diferente actividad entre las proteínas, aunque se mantenga conservada el dominio transmisor, esclarecería como actúa RetS sobre la cascada Gac/Rsm en *A. vinelandii*.

Los mecanismos que llevan a la variación de fase no se han descrito. Aun siendo esto, en *P. protegens* ha sido asociado el fenómeno de variación de fase sobre los genes, del TCS GacS/A, a la síntesis de los metabolitos secundarios (Yan et al., 2018). En la cual, los compuestos de mayor carga metabólica aumentan la frecuencia de obtención de subpoblaciones *gac*⁻. Asimismo, está ampliamente reportado la acumulación de mutantes *gac*⁻ en medios de cultivo rico en las *Pseudomonas* (Bull et al., 2001; Song, Kidarsa, van de Mortel, Loper, & Raaijmakers, 2016; Yan et al., 2018). Aun siendo esto, la diferencia del uso de estos medios contrasta con los usados para *A. vinelandii*, puesto que el medio utilizado en el presente trabajo es un medio mínimo. Por ello, es sumamente importante determinar si el fenómeno de variación de fase esté sucediendo en las mutantes AEIV*retS*::km y de ser así, sea por una acumulación de mutantes *gac*⁻. La cual

puede ser promovida por el uso del medio BS y si cambia a partir de sembrar las cepas en otros medios. Pudiendo ser que la transición del fenotipo blanco/mucoide al alternativo podría darse en distinta frecuencia, al utilizar otras condiciones.

En *A. vinelandii* existen menos TCSs respecto a en *P. aeruginosa*, en la que la presencia de menos sistemas podría otorgar mayor carga de regulación a una vía. Siendo posible que la mutación de *retS* genere un desbalance en las cascadas de regulación y aumente la frecuencia de cambio, a un fenotipo *gac*⁻, el cual sea mayor al respecto al observado en las condiciones utilizadas en la WT.

La regulación sobre la variación de fase ejercida por los TCSs, también se ha reportado en otras bacterias. En *Acinetobacter baumannii*, el ortólogo al TCS OmpR/EnvZ se encuentra involucrado en el fenómeno de variación de fase. La mutación en uno de los componentes de este sistema genera un desbalance del intercambio entre los fenotipos, aumentando la frecuencia hacia uno (KA & PN, 2017). Por lo tanto, una posible explicación al fenotipo cambiante en las mutantes AEIV*retS*::km pueda deberse a que RetS se encuentre involucrado en este proceso pre-adaptativo. Cuya mutación aumente la frecuencia del cambio fenotípico a uno *gac*⁻. Por lo que se requiere detectar si RetS está involucrado en el proceso de variación de fase o también el TCS GacS/GacA. En la que la mutación de uno de los genes *gac* no mostraría las subpoblaciones a partir de la medición de los metabolitos secundarios regulados por la cascada.

Parte fundamental del impacto que ejerza la variación de fase sobre el genoma dependerá la expresión de los sistemas de reparación. La expresión en cierto intervalo, a lo largo de la curva de crecimiento o mutación sobre los componentes involucrados, de aquellos sistemas, permitirá cambios estocásticos en la bacteria (M. S. Vincent & Uphoff, 2020). En distintas *Pseudomonas* el TCS GacS/GacA está involucrado en la vía de regulación de la expresión de *mutS*. Este gen codifica para MutS, que es parte del sistema de reparación de mismatch (MMRS) (Fishel, 1998), cuya regulación es de manera indirecta, a partir de *rpoS* y regulado positivamente, el último, por el TCS GacS/A. Además RpoS regula negativamente a *mutS*. Aunado a ello, un aumento en la tasa de mutación está promovida en relación con la expresión de sigma S. De igual manera, la

represión de *mutS* promueve el aumento de mutaciones a lo largo del genoma. Dentro de los que se encuentra a los genes del TCS GacS/ A (Maharjan & Ferenci, 2014; van den Broek, Chin-A-Woeng, Bloemberg, & Lugtenberg, 2005).

Por lo anterior, otra posible, explicación del cambio fenotípico de las mutantes AEIV*retS*::km puede deberse a un aumento de GacA-P. En la que habría un efecto positivo sobre la expresión de *rpoS* y reprima a *mutS*. Aunado a ello, existe un homólogo a MutS en *A. vinelandii*, cuya mutación aumenta la frecuencia de mutantes en tal fondo genético (Le, Shen, Iismaa, & Burgess, 1993). Además, el TCS GacS/A en *A. vinelandii* regula positivamente la expresión de *rpoS*. Por lo que un aumento de los niveles de sigma S, pudiesen reprimir la expresión de *mutS* y por consecuente aumentar la tasa de mutación en el fondo genético de *retS*. Por lo tanto, partiendo de que RetS sea un regulador negativo que al mutarse, promueva la cascada que reprima a *mutS* y, por consecuente, aumente la frecuencia de obtención de mutantes *gacS*⁻ y *gacA*⁻. Por ende, el fenotipo café/no mucoide de las mutantes AEIV*retS*::km sería multifactorial. En cuyo fondo genético habría más de un gen afectado y por consecuente, no podría determinarse el papel de esta HK a partir de cuantificar a los metabolitos regulados por la cascada Gac/Rsm.

La dificultad para establecer el fenotipo que se da en las mutantes AEIV*retS*::km se contraponen con la complementación en *cis*. En estas cepas el fenotipo era sumamente similar respecto a la silvestre, lo cual apoyaba a que RetS es un regulador positivo de la cascada y que el fenotipo observado era únicamente debido a su mutación. Aun siendo esto, con lo observado en los estadios de las mutantes AEIV*retS*::km abren a la pregunta si con las cepas complementadas es suficiente para aseverar que el fenotipo es dado únicamente por *retS*. Dado a que no se pudo complementar a las mutantes AEIV*retS*::km en su estadio café/no mucoide y se optó por agregar alelos a la WT, seguido de la mutación del alelo nativo de *retS*. Por consecuente, nunca hubo ningún desbalance que pudiera promover cambios adaptativos. Asimismo, con ello habría una nueva posible respuesta a la falta de restauración de los fenotipos en las mutantes AEIV*retS*::km que fueron complementadas en *trans*, partiendo de su estadio café/no mucoide. Por lo que el

fenotipo sea multifactorial, por lo cual no se pueda restaurar el fenotipo con solo regresar al alelo silvestre de *retS*.

A partir de todo lo previamente mencionado, definir el papel de RetS a partir de los fenotipos observados puede ser inexacto. Dado que sería requerido demostrar que solamente el fenotipo observado es debido a la mutación de *retS* y en caso de serlo, cuál es el fenotipo de las mutantes y cuál se toma para adjudicar una actividad. Por lo que se exhorta buscar nuevas herramientas para sustentar tal aseveración. Existen algoritmos para poder predecir secuencias reconocidas por invertasas (Jiang et al., 2019). Aun siendo esto, se requiere precaución en caso de que no se reconozca una secuencia, dada a la conservación de la secuencia consenso. En *Clostridiodes difficile* se ha reportado que una recombinasa se encuentra asociada a la regulación de los factores de virulencia. Aunque debido a que carecía de alta conservación la secuencia consenso, dificultó su detección (Garrett et al., 2019).

Una forma de clasificar a las recombinasas es en adyacentes y de múltiples sitios de acción. Las primeras se encuentran codificadas cerca de la secuencia que reconocen, mientras que las segundas tienen más de dos, siendo uno adyacente (Trzilova & Tamayo, 2021). Dado que se exploró en el genoma de *A. vinelandii* el locus de los genes *gacS/gacA* y no encontró un gen que codificara para una putativa recombinasa puede complicar el esclarecimiento del fenotipo. Esto principalmente a que haya una recombinasa que se encuentre mediando recombinaciones en distintos segmentos del genoma. Aunque se ha reportado que las recombinasas SSS y XerD se encuentran involucradas en la variación de fase en *P. fluorescens*, la presencia de estas no indica que se encuentren expresadas. Razón por la cual es requerido comprobar su expresión. Asimismo, existen homólogos de SSS, XerC, al igual que la de XerD en el fondo genético de *A. vinelandii* (Martínez-Granero et al., 2005).

En caso de que en las mutantes AEIV*retS*::km se de un fenómeno de variación de fase y no sea partir de invertasas, y sea a partir de otro mecanismo. En caso de que sea a partir de SSR existen programas para su detección (Aidley, Wanford, Green, Sheppard, & Bayliss, 2018), aunque no hay reportes de su empleo para la detección de SSR en el

género de las *Pseudomonas*. Por último, existe la posibilidad de que la variación de fase sea por otra alteración independiente del TCS GacS/A o sumado. En este caso existen reportes exitosos de utilizar distintas técnicas de secuenciación para la detección de inversiones, dado que existan otros elementos reguladores, que no se hayan elucidado, de los metabolitos afectados.

8.- Conclusiones

- Las cepas complementadas en *cis* sí restauran la síntesis de los metabolitos afectados en las mutantes AEIV*retS*::km.
- Las mutantes AEIV*retS*::km presentan dos fenotipos, que afectan la expresión de los metabolitos alginatos y alquilresorcinoles.

9.- Perspectivas

- Determinar si el efecto sobre la producción de alginato y ARs en el fondo genético AEIV*retS*::km en su estadio café/no mucoide es unicamente debido a la mutación de *retS*.
- Se requiere estudiar a profundidad el papel de RetS y, el posible efecto, en la variación de fase, para poder determinar la actividad de esta proteína.
- Esclarecer si bajo ciertas condiciones se promueve el cambio fenotípico en las mutantes AEIV*retS*::km.

10.- Material y Métodos.

10.1.- Plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción	Referencia
pGem- <i>retS</i> ::km NP	Vector pGem-T-Easy en el cual fue clonado la región citoplasmática de <i>RetS</i> con la inserción en su sitio <i>Cla</i> I un casete de resistencia a kanamicina, convergente a la transcripción del gen.	(Reyes Nicolau, 2018).
pGem- <i>retS</i> ::km P	Vector pGem-T-Easy donde se clonó a la región citoplasmática de <i>RetS</i> donde se insertó en su sitio <i>Cla</i> I de un casete de resistencia a kanamicina divergente a la transcripción de <i>retS</i> .	(Reyes Nicolau, 2018).
pUMA-tc	Vector integrativo el cual tiene clonado al gen <i>meIA</i> que tiene una inserción en su sitio <i>Xho</i> I un casete de resistencia a tetraciclina.	(Cocotl-Yañez et al., 2014).
pCR2.1-TOPO	Vector de mantenimiento donde se va a clonar al gen <i>retS</i> .	Thermofisher.
pCR2.1-TOPO- <i>retS</i>	Vector de mantenimiento donde se clonó al gen <i>retS</i> con su región reguladora.	Este trabajo.
pRK2013	Es un plásmido utilizado para la movilización de plásmidos no transmisibles por sí mismos. El cual tiene un casete de resistencia a Kanamicina.	(Ditta, Stanfield, Corbin, & Helinski, 1980)
pBBR1MCS-5	Vector movilizable de amplio rango de hospedero, proveniente del vector pBBR1MCS. Que contiene un casete de resistencia a gentamicina.	(Kovach et al., 1995).
pBBR1MCS-5- <i>retS</i>	Vector movilizable, derivado del plásmido pBBR1MCS-5. Que contiene un casete de resistencia a gentamicina. Donde se clonó al gen <i>retS</i> con su región reguladora.	Este trabajo.
pUMA-tc- <i>retS</i>	Vector integrativo, proveniente del plásmido pUMA-tc. Donde se clonó al gen <i>retS</i> con su región reguladora.	Este trabajo.

10.2.- Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia	Longitud (bp)	Tm (°C)
ER1RR_RetS_Fw	5'-GAA TTC TGA AAG CCT GCG ATA ATC A -3'	25	55.6
RRetS-S1	5'-TAT GTC GAC TCA GGG ATG AAG CGC GTG -3'	27	63.6
Hsp70_RTIRv	5'-CGC TCC TCG AAG TTG AAG AA-3'	20	54.8
TcFw	5'-GCT AGC AGC ACG CCA TAG TGA-3'	21	59.7
M13F23	5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA-3'	21	55.3

10.3.- Cepas empleadas.

Nombre	Descripción	Referencia	Medios de cultivo
<i>Escherichia coli</i> DH5- α	<i>dlacZ</i> Delta M15 Delta (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1	(Woodcock et al., 1989).	Luria Bertani (LB). SOC.
<i>Escherichia coli</i> K12 HB101	F ⁻ <i>araC14 leuB6</i> (Am) Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>lacY1 glnX44</i> (AS) <i>galK2</i> (Oc) λ^{-} <i>recA13 rpsL20 xylA5 mtl-1 thiE1</i> [<i>hsdS20</i>]	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)	Luria Bertani (LB).
AEIV	Cepa silvestre de <i>Azotobacter vinelandii</i> , NaI ^R .	(Larsen & Haug, 1971).	Burk Sacarosa (BS). Medio de competencia (CM).
AEIV <i>retS</i> ::km NP mucoide	Derivada de la cepa AEIV, la cual tiene una inserción en el gen <i>retS</i> de un casete de resistencia a kanamicina, convergente a su transcripción. La cual presenta un fenotipo mucoide y las colonias son blancas.	(Reyes Nicolau, 2018).	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km NP no mucoide	Derivada de la cepa AEIV, la cual tiene una inserción en el gen <i>retS</i> de un casete de resistencia a kanamicina convergente a su transcripción. La cual no sintetiza alginato y las colonias son cafés.	(Reyes Nicolau, 2018).	Burk Sacarosa (BS).

AEIV <i>retS</i> ::km P mucoide	Derivada de la cepa AEIV, la cual tiene una inserción en el gen <i>retS</i> de un casete de resistencia a kanamicina divergente a su transcripción. La cual presenta un fenotipo mucoide y las colonias son blancas.	(Reyes Nicolau, 2018).	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km P no mucoide	Derivada de la cepa AEIV, la cual tiene una inserción en el gen <i>retS</i> de un casete de resistencia a kanamicina divergente a su transcripción. La cual no sintetiza alginato y las colonias son café.	(Reyes Nicolau, 2018).	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km NP pBBR1MCS-5- <i>retS</i>	Derivada de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km NP no mucoide, donde se integró al vector pBBR1MCS-5- <i>retS</i> . Es la complementada en <i>trans</i> -.	Este trabajo	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km P pBBR1MCS-5- <i>retS</i>	Derivada de la mutante AEIV <i>retS</i> ::km P no mucoide, donde se integró al vector pBBR1MCS-5- <i>retS</i> . Es la complementada en <i>trans</i> -.	Este trabajo	Burk Sacarosa (BS).
AEIV pUMA- <i>tc-retS</i>	Cepa AEIV en la cual se integró al gen <i>retS</i> con su región reguladora en el locus neutro <i>meIA</i> .	Este trabajo.	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km NP pUMA- <i>tc-retS</i>	Derivada de cepa AEIVpUMA- <i>tc-retS</i> donde se mutó al gen <i>retS</i> , a través de una inserción de un casete de resistencia a kanamicina en su sitio <i>Clal</i> en sentido convergente de su transcripción.	Este trabajo.	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i> ::km P pUMA- <i>tc-retS</i>	Derivada de cepa AEIVpUMA- <i>tc-retS</i> donde se mutó al gen <i>retS</i> , a través de una inserción de un casete de resistencia a kanamicina en su sitio <i>Clal</i> en sentido divergente de su transcripción.	Este trabajo.	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>retS</i>	Cepa AEIV que tiene integrado al vector pBBR1MCS-5- <i>retS</i> .	Este trabajo.	Burk Sacarosa (BS).
AEIV <i>gacA</i> ::gm	Cepa derivada de la silvestre, donde se mutó al gen <i>gacA</i> a partir de insertar un casete de resistencia a Gentamicina.	(Castañeda et al., 2001).	Burk Sacarosa (BS).

10.4.- Medios de cultivo.

- Medios utilizados para *A. vinelandii*:

Burk Sacarosa (BS)

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	200.0	K ₂ HPO ₄	8.0
KH ₂ PO ₄	2.0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.3
Na ₂ SO ₄	18.3	MgCl ₂ ·6H ₂ O	16.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.2

*Agar bacteriológico: 1.5%

Medio Burk *n*-Butanol (BBOH)

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
<i>n</i> -Butanol	20 mL/L	K ₂ HPO ₄	8.0 g/L
KH ₂ PO ₄	2.0 g/L	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.3 g/L
Na ₂ SO ₄	18.3 g/L	MgCl ₂ ·6H ₂ O	16.0 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 g/L	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.2 g/L

*Agar bacteriológico: 1.5%

Medio de competencia (CM)

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	200.0	K ₂ HPO ₄	8.0
KH ₂ PO ₄	2.0	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7.3
Na ₂ SO ₄	18.3	MgCl ₂ ·6H ₂ O	16.0

*Agar bacteriológico: 1.5%

Medio LB+BS (9:15)

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	125	K ₂ HPO ₄	5.0

KH₂PO₄	1.25	CaCl₂·2H₂O	4.5
Na₂SO₄	11.4	MgCl₂·6H₂O	10.0
Extracto de levadura	3.75	Peptona de caseína	1.9
NaCl	1.9		

*Agar bacteriológico: 1.5%

- Medios para *E. coli*:

Medio Luria Bertani (LB)

Compuesto	Concentración (g/L)	Compuesto	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10.0	Peptona de caseína	5.0
NaCl	5.0		

*Agar bacteriológico: 1.5%

Medio SOC

Compuesto	Concentración (para 200mL)	Compuesto	Concentración (para 200 mL)
Extracto de levadura	4.0 g.	Peptona de caseína	1.0
NaCl	0.1 g.		

- Mezclar y adicionar dos mL de KCl 250mM para 200 mL de SOB
- Ajustar pH a 7 con NaOH 5N
- Ajustar el volumen a 195 mL y esterilizar por autoclave.
- Adicionar un mL de MgCl₂ 2M
- Adicionar cuatro mL de glucosa 1M a 200mL de medio SOB para preparar el medio SOC.

10.5.- Metodologías.

10.5.1.- Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.

- 1.- Realizar un cultivo de 3-5 mL de medio LB, con el antibiótico de selección de *E. coli*.
- 2.- Incubar a 37 °C por 12 horas.
- 3.- Cosechar las células por centrifugación y lavarlas con un mL de MgSO₄ 10mM (2x)
- 4.- Resuspender el paquete celular en 100 µL de la solución I helada (Glucosa/Dextrosa 50 mM, EDTA 10 mM, 25µl TRIS a pH8) y vortexear hasta que se resuspenda.
- 5.- Agregar 200 µL de la solución II, preparada al momento (80% H₂O, 10% NaOH 2N, 10% SDS), y mezclar por inversión. Seguido de una incubación en hielo por 10 minutos.
- 6.- Adicionar 150 µL de solución III (40 ml de CH₃COOK 3M ajuste de pH 4.8 con ácido acético glacial) e incubar por 10 minutos, en hielo.
- 7.- Centrifugar por 15 minutos a 13'000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8.- Añadir 10 µL de sílica y reposar por cinco minutos.
- 9.- Centrifugar dos minutos a 13'000 rpm y lavar con 500 µL de New Wash (3x).
- 10.- Dejar secar a 37°C y resuspender en 20 µL de RNAsa diluida.
- 11.- Incubar una hora a 37°C.
- 12.- Centrifugar a 13'200 rpm para recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo, libre de sílica.

10.5.2.- Extracción de DNA plasmídico por MAXIPREP.

- 1.- A partir de un cultivo de 50 mL, con el antibiótico de selección, cosechar las células por centrifugación.
- 2.- Lavar las células con MgSO₄ 10mM y resuspender en 1.5 mL de la solución I.
- 3.- Agregar 3.5 mL de la solución II y mezclar por inversión.
- 4.- Añadir 2.5 mL de la solución III, mezclando suavemente.
- 5.- Incubar por 10 minutos, seguido centrifugar por 10 minutos a 6'000 rpm.

- 6.- Transferir, cuidadosamente, el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon y adicionar cinco mL de isopropanol.
- 7.- Incubar por 10 minutos en hielo y centrifugar a 6'000 rpm.
- 8.- Decantar el sobrenadante y lavar, tres veces, con etanol al 70%.
- 9.- Secar a 50°C y resuspender el pellet en 200 µL de RNAsa diluida.
- 10.- Incubar toda la noche a 37°C.

10.5.3.- Extracción de banda de gel de electroforesis.

- 1.- Realizar la electroforesis y teñir el gel con bromuro de etidio (BET).
- 2.- Visualizar la banda de interés del gel en el trans-iluminador de baja potencia.
- 3.- Delimitar los bordes de la banda a cortar.
- 4.- Apagar el trans-iluminador y proseguir con el aislamiento del fragmento.
- 5.- Vierte la banda en un tubo eppendorf y pesarla.
- 6.- Agregar tres volúmenes, del peso, de NaI 6M al tubo eppendorf e incubar a 50°C hasta que se disuelva el gel.
- 7.- Añadir 10 µL de sílica e incubar por cinco minutos, a temperatura ambiente.
- 8.- Centrifugar por un minuto a 13'000 rpm.
- 9.- Decantar el sobrenadante y agregar con 500 µL de New Wash.
- 10.- Centrifugar nuevamente a 13'000 rpm, repitiendo éste con el paso previo tres veces.
- 11.- Realizar una última centrifugación para remover el exceso de solución.
- 12.- Dejar secar la pastilla y resuspender en un volumen adecuado.

10.5.4.- Preparación de células competentes de *A. vinelandii*.

- 1.- A partir de una placa fresca de BS inocular una placa de CM (1^{er} pase).
- 2.- Incubar por 48 horas a 30°C.
- 3.- Consecuentemente tomar una asada e inocular, masivamente, otra placa de CM (2^{do} pase).
- 4.- Incubar por 24 horas a 30°C.

- 5.- Levantar el tapete y lavar con MgSO_4 10 mM.
- 6.- Recuperar el paquete celular por centrifugación a 13'000, por 10 minutos.
- 7.- Consecuentemente se puede realizar la transformación.

10.5.5.- Transformación de *A. vinelandii*.

- 1.- En un tubo eppendorf mezclar 200 μL de células competentes y 10-20 μL de DNA plasmídico.
- 2.- Verter en una placa de CM, dejándolo secar, en incubar a 48°C.
- 3.- Levantar el tapete y lavar con MgSO_4 10 mM, realizándolo hasta quitar el alginato.
- 4.- Resuspender en MgSO_4 10 mM o BS líquido el paquete celular y verter en una placa de BS con el marcador de selección.
- 5.- Distribuir homogéneamente utilizando perlas y dejar secar.
- 6.- Incubar por 48 horas a 30°C para seleccionar candidatas.

10.5.6.- Ensayo de conjugación triparental para *A. vinelandii*.

- 1.- De una placa fresca BS, de las cepas de interés, tomar una asada e inocular para hacer un pre-cultivo de 25 mL de caldo BS con su marcador de selección.
- 2.- Incubar por 24 horas a 30°C.
- 3.- Centrifugar el cultivo y lavar con MgSO_4 .
- 4.- Resuspender en un mL de BS líquido o MgSO_4 y añadir 24 mL de caldo BS.
- 5.- Incubar por 48 horas a 30°C.
- 6.- El mismo día, sembrar a las cepas donadoras, de *E. coli*, en placas de medio LB, con su respectivo marcador de selección.
- 6.- A 12 horas de que se cumpla el tiempo de incubación, realizar un pre-cultivo de cinco mL las cepas donadoras (cepa de *E. coli* DH5 α con la construcción movilizable y la cepa K12 HB101 [Helper]) e incubar toda la noche.
- 7.- De los pre-cultivos tomar 500 μL e inocular 4.5 mL de caldo LB e incubar por dos horas para poner en fase con los cultivos de *A. vinelandii*.

- 8.- Centrifugar los cultivos y lavar con MgSO₄.
- 9.- Resuspender en un mL de MgSO₄
- 10.- En un tubo eppendorf mezclar distintas relaciones de las cepas a utilizar.
- 11.- Inocular el contenido del tubo en una placa de agar LB+BS y dejar que se seque.
- 12.- Incubar de 24-72 horas a 30°C.
- 13.- Levantar el tapete y lavar con MgSO₄.
- 14.- Resuspender en un mL de MgSO₄ o BS líquido.
- 15.- Hacer cuatro series de diluciones.
- 16.- Inocular 200 µL en distintas placas de agar BS con el marcador selección de las últimas tres diluciones.
- 17.- Agregar unas perlas para distribuir homogéneamente en la placa y dejar secar.
- 18.- Incubar por 48-72 horas a 30°C, para seleccionar candidatas.

10.5.7.- Extracción de DNA genómico de *A. vinelandii*.

- 1.- De una placa fresca de BS inocular otra con el marcador de selección.
- 2.- Incubar por 48 horas a 30°C.
- 3.- Cosechar las células y lavar con MgSO₄ 10 mM.
- 4.- Resuspender en 450 µL de TRIS EDTA 50/20.
- 5.- Agregar 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubar 30 minutos a 37°C.
- 6.- Añadir 30 µL de proteasa (10mg/mL) incubar 30 minutos a 37°C.
- 7.- Adicionar 50 µL de SDS (10%) e incubar 15 minutos a 37°C.
- 8.- Añadir 100 µL de NaCl 5 M e incubar 10 minutos a 65°C.
- 9.- Agregar 80 µL de solución CTAB 10% NaCl 0.7M (previamente incubada a 65°C) e incubar 20 minutos a 65°C.
- 10.- Adicionar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar por 5 minutos.
- 11.- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 10 µL de sílica, para posteriormente centrifugar un min, decantar sobrenadante.
- 12.- Lavar 500 µL de solución NEW WASH, tres veces, y dejar secar la pastilla a 50 °C.
- 13.- Resuspender en 30 µL de RNAsa diluida e incubar a 37°C por una hora.

10.5.8.- Cuantificación de alginatos por el método de carbazol.

- 1.- Realizar un pre-cultivo en 25 mL en caldo BS, con el marcador de selección, por 24 horas.
- 2.- Centrifugar los cultivos y lavar con $MgSO_4$ o BS líquido para eliminar el alginato.
- 3.- Resuspender en un mL e inocular 24 mL de caldo BS, sin el marcador de selección, por 48 horas.
- 4.- Cosechar una porción del cultivo, decantando es sobrenadante en otro tubo.
- 5.- Añadir cierto volumen de la solución EDTA 0.01 M, agitar y centrifugar por 10 minutos a 4'000 rpm.
- 6.- Quitar el resto del sobrenadante y verter al tubo previamente mencionado.
- 7.- El sobrenadante es precipitado con dos volúmenes de isopropanol helado e incuba por 10 minutos a 4°C.
- 8.- Centrifugar el sobrenadante por 15 minutos y decantar, evitando verter el alginato.
- 9.- Dejar secar y resuspender en un volumen adecuado de H_2O o en solución NaCl 0.85%.
- 10.- En un tubo de ensayo, previamente enfriado, se agrega tres mL de solución ácido sulfúrico-boratos 1:40.
- 11.- Adicionar 350 μL de la solución problema. A la par se realiza la curva de calibración estándar de las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 100 μg de alginato/mL de solución.
- 12.- Se añade 100 μL de carbazol al 0.1% y agitar cuidadosamente.
- 13.- Se colocan en un baño maría a 50°C por 30 minutos.
- 14.- Leer la absorbancia a 530 nm y se reporta con base a la curva de calibración estándar. Donde las unidades son mg de alginato/ μg de proteína.

10.5.9.- Cuantificación de proteína por el método de Lowry.

- 1.- Del cultivo tomar un mL y centrifugar hasta obtener el paquete celular.

- 2.- Lavar con MgSO₄ 10mM o NaCl 0.85% y resuspender en un mL.
- 3.- Pipetear el volumen adecuado, para obtener los valores dentro de la curva estándar.
- 4.- Llevar la muestra a un volumen de 200 µL con H₂O dd.
- 5.- Añadir un mL de la solución reactiva e incubar por 10 minutos.
- 6.- Añadir 100 µL de reactivo de Folin diluido con un volumen de H₂O dd.
- 7.- Dejar reposar por 30 minutos.
- 8.- Leer la absorbancia a 625 nm.

*Al mismo tiempo realizar una curva de calibración estándar, con los siguientes valores:

µl STOCK	Concentración de albúmina µg/mL
2 µL +198 µL H ₂ O dd	4
4 µL +196 µL H ₂ O dd	8
8 µL + 192µL H ₂ O dd	16
16 µL + 184 µL H ₂ O dd	32
32 µL + 168 µL H ₂ O dd	64

10.5.10.- Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

- 1.- Tomar un mL del cultivo y centrifugar por dos minutos a 12'000 rpm.
- 2.-Decantar el sobrenadante y lavar las células con MgSO₄ 10mM.
- 3.- Resuspender el paquete celular y tomar 50 µL y afora a 500 µL con H₂O dd.
- 4.- Agregar 500 µL del reactivo de Bradford
- 5.- Leer la absorbancia a 595 nm.

*A la par se realiza una curva de calibración estándar, con los siguientes valores:

Albúmina (2mg/mL)	H ₂ O dd	Reactivo de Bradford
2 µL	498 µL	500 µL
4 µL	496 µL	500 µL
8 µL	492 µL	500 µL

16 µL	484 µL	500 µL
32 µL	468 µL	500 µL
64 µL	436 µL	500 µL
Blanco	500 µL	500 µL
Muestras		
50 µL de células	450 µL	500 µL

10.5.11.- Ensayo cualitativo de síntesis de Alquilresorcinoles.

- 1.- A partir de una placa de agar BS plaquear otra con el marcador de selección.
- 2.- Incubar por 48 horas a 30°C.
- 3.- Inocular 25 mL de caldo BS con las cepas de interés.
- 4.- Centrifugar los cultivos y lavar el paquete celular con MgSO₄.
- 5.- Resuspender en un mL de MgSO₄ y cuantificar por el método de Bradford, evitando realizar la curva de calibración estándar.
- 6.- A partir de las absorbancias, realizar la dilución correspondiente para tener todas las cepas de interés a una absorbancia similar.
- 7.- Tomar 200 µL de la dilución e inocular placas de agar BBOH, sobre un filtro previamente esterilizado.
- 8.- Incubar por cinco días a 30°C.
- 9.- Teñir a las células con sales Fast Blue B y esperar a que se seque.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
CH ₃ COOH	1 mL	5%
Fast Blue B	0.016g	0.08%
H ₂ O	Aforar a 20 mL	
C ₃ H ₈ O	80 mL	

*La cantidad de propanol es siempre cuatro partes con respecto a la solución de CH₃COO + Fast Blue B.

11.- Anexos

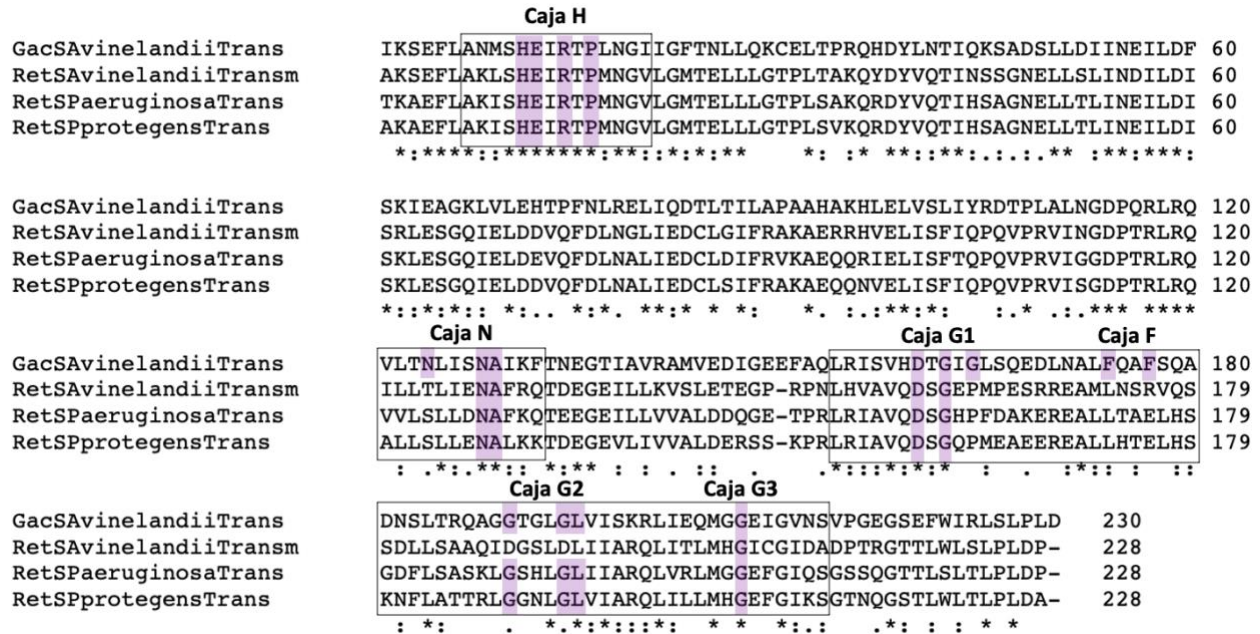


Fig. 38. Alineamientos de los dominios transmisores de las HKs RetS de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa* y *P. protegens* Pf-5; y la de GacS de *A. vinelandii*.

12.- Bibliografía

- Aidley, J., Wanford, J. J., Green, L. R., Sheppard, S. K., & Bayliss, C. D. (2018). Phasomelt: an “omics” approach to cataloguing the potential breadth of phase variation in the genus *Campylobacter*. *Microbial Genomics*, *4*(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000228>
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2003). Application of comparative genomics in the identification and analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics*, *4*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-34>
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S., & Bourret, R. B. (1996). Signal Transduction via the Multi-Step Phosphorelay: Not Necessarily a Road Less Traveled. *Cell*, *86*(6), 845–848. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80158-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80158-0)

- Atack, J. M., Guo, C., Yang, L., Zhou, Y., & Jennings, M. P. (2020). DNA sequence repeats identify numerous Type I restriction-modification systems that are potential epigenetic regulators controlling phase-variable regulons; phasevarions. *The FASEB Journal*, 34(1), 1038–1051. <https://doi.org/10.1096/fj.201901536RR>
- AY, B., SP, P., Y, L., C, L., W, K., P, C., & K, D. (2017). Characterization of the Direct Interaction between Hybrid Sensor Kinases PA1611 and RetS That Controls Biofilm Formation and the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infectious Diseases*, 3(2). <https://doi.org/10.1021/ACSINFECDIS.6B00153>
- Bhate, M. A. P., Molnar, K. A. S., Goulian, M., & Degrado, W. F. (2015). Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures. *Structure*. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.04.002>
- Bordi, C., Lamy, M.-C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., ... Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 76(6), 1427–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07146.x>
- Bouillet, S., Ba, M., Houot, L., Iobbi-Nivol, C., & Bordi, C. (2019). Connected partner-switches control the life style of *Pseudomonas aeruginosa* through RpoS regulation. *Scientific Reports*, 9(1), 6496. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42653-5>
- Boyer, H. W., & Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 41(3), 459–472. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90288-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90288-5)
- Broder, U. N., Jaeger, T., & Jenal, U. (2016). LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Microbiology*, 2, 16184. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.184>
- Bull, C. T., Duffy, B., Voisard, C., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (2001). Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3/4), 327–336. <https://doi.org/10.1023/A:1012061014717>
- Campos, M., Martínez-Salazar, J. M., Lloret, L., Moreno, S., Núñez, C., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (1996). Characterization of the gene coding for GDP-mannose dehydrogenase (*algD*) from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 178(7),

- 1793–1799. <https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1793-1799.1996>
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *182*(9), 2624–2628. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762268>
- Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *183*(23), 6787–6793. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6787-6793.2001>
- Chambonnier, G., Redelberger, D., Fadel, F., & Filloux, A. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS / GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*, 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006032>
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor Domains of Two-Component Regulatory Systems. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 116. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2010.01.016>
- CL, M., M, R., SL, K., T, C., S, H., & KP, L. (2016). RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small non-coding RsmA-binding RNA upregulated in biofilm versus planktonic growth conditions. *BMC Microbiology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0771-Y>
- Clarke, P. H. (1990). Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunist pathogen. In *Pseudomonas Infection and Alginates* (pp. 1–12). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1836-8_1
- Clementi, F. (1997). Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*. *Critical Reviews in Biotechnology*, *17*(4), 327–361. <https://doi.org/10.3109/07388559709146618>
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., & Espín, G. (2014). A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, *160*(3), 479–487. <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>
- Collie, N., & Myers, W. S. (1893). VII.—The formation of orcinol and other condensation products from dehydracetic acid. *J. Chem. Soc., Trans.*, *63*(0), 122–128. <https://doi.org/10.1039/CT8936300122>

- Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., & Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *Journal of Bacteriology*, *177*(17), 5108–5115. <https://doi.org/10.1128/jb.177.17.5108-5115.1995>
- Daines, D. A., Granger-Schnarr, M., Dimitrova, M., & Silver, R. P. (2002). Use of LexA-based system to identify protein-protein interactions in vivo. *Methods in Enzymology*, *358*, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)58087-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)58087-3)
- Deretic, V., & Konyecsni, W. M. (1990). A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: clonal variation of repeats within *algP*, a gene involved in regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *172*(10), 5544–5554. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.5544-5554.1990>
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., & Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(12), 7347–7351. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7347>
- Ertesvåg, H. (2015). Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00523>
- Ertesvåg, H., Høidal, H. K., Schjerven, H., Svanem, B. I. G., & Valla, S. (1999). Mannuronan C-5-Epimerases and Their Application for in Vitro and in Vivo Design of New Alginates Useful in Biotechnology. *Metabolic Engineering*, *1*(3), 262–269. <https://doi.org/10.1006/MBEN.1999.0130>
- Fischer, R. (2014). Promiscuity Breeds Diversity: The Role of Polyketide Synthase in Natural Product Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, *21*(6), 701–702. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2014.05.011>
- Fishel, R. (1998). Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes & Development*, *12*(14), 2096–2101. <https://doi.org/10.1101/gad.12.14.2096>
- Francis, V. I., & Porter, S. L. (2019). Multikinase Networks: Two-Component Signaling Networks Integrating Multiple Stimuli. *Annual Review of Microbiology*, *73*(1), 199–223. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115846>
- Francis, V. I., Waters, E. M., Finton-James, S. E., Gori, A., Kadioglu, A., Brown, A. R., &

- Porter, S. L. (2018). Multiple communication mechanisms between sensor kinases are crucial for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 9(1), 2219. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04640-8>
- Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., & Horinouchi, S. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6356–6361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511227103>
- G, G., C, N., JB, G., AS, L., R, N., M, C., ... G, S.-C. (2004). Characterization of the *Azotobacter vinelandii* algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1). <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.07.044>
- Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., & Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>
- Gama-Castro, S., Núñez, C., Segura, D., Moreno, S., Guzmán, J., & Espín, G. (2001). *Azotobacter vinelandii* Aldehyde Dehydrogenase Regulated by $\zeta 54$: Role in Alcohol Catabolism and Encystment. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6169. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6169-6174.2001>
- Gao, R., Bouillet, S., & Stock, A. M. (2019). Structural Basis of Response Regulator Function. *Annual Review of Microbiology*, 73, 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115931>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Garrett, E. M., Sekulovic, O., Wetzal, D., Jones, J. B., Edwards, A. N., Vargas-Cuebas, G., ... Tamayo, R. (2019). Phase variation of a signal transduction system controls *Clostridioides difficile* colony morphology, motility, and virulence. *PLoS Biology*, 17(10), e3000379. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000379>
- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P., & Lin, E. C. (1998). Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32864–32869.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32864>

- Gimmestad, M., Ertesvåg, H., Heggeset, T. M. B., Aarstad, O., Svanem, B. I. G., & Valla, S. (2009). Characterization of Three New *Azotobacter vinelandii* Alginate Lyases, One of Which Is Involved in Cyst Germination. *Journal of Bacteriology*, *191*(15), 4845. <https://doi.org/10.1128/JB.00455-09>
- Golemi-Kotra, D. (2008). *Pseudomonas* Infections. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.63828-0>
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S., & Lory, S. (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, *7*(5), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.020>
- H, M.-R., J, G., S, M., G, S.-C., & G, E. (1997). The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene*, *199*(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00380-6)
- Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. A. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial Biotechnology*, *6*(6), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>
- Heeb, S., Blumer, C., & Haas, D. (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, *184*(4), 1046–1056. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1046-1056.2002>
- Heeb, S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., & Haas, D. (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, *243*(1), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.008>
- Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, *158*(8), 1953–1963. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>
- Hitchins, V. M., & Sadoff, H. L. (1970). Morphogenesis of cysts in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *104*(1), 492–498.

- <https://doi.org/10.1128/JB.104.1.492-498.1970>
- Hrabak, E. M., & Willis, D. K. (1992). The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *Journal of Bacteriology*, *174*(9), 3011–3020.
<https://doi.org/10.1128/jb.174.9.3011-3020.1992>
- Huang, H., Shao, X., Xie, Y., Wang, T., Zhang, Y., Wang, X., & Deng, X. (2019). An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, *10*(1), 2931.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10778-w>
- Igo, M. M., Ninfa, A. J., Stock, J. B., & Silhavy, T. J. (1989). Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes & Development*, *3*(11), 1725–1734.
<https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1725>
- Janssen, K. H., Diaz, M. R., Gode, C. J., Wolfgang, M. C., & Yahr, T. L. (2018). RsmV, a Small Noncoding Regulatory RNA in *Pseudomonas aeruginosa* That Sequesters RsmA and RsmF from Target mRNAs. *Journal of Bacteriology*, *200*(16).
<https://doi.org/10.1128/JB.00277-18>
- JENSEN, H. L. (1954). The Azotobacteriaceae. *Bacteriological Reviews*, *18*(4), 195–214. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13219046>
- Jiang, X., Hall, A. B., Arthur, T. D., Plichta, D. R., Covington, C. T., Poyet, M., ... Xavier, R. J. (2019). Invertible promoters mediate bacterial phase variation, antibiotic resistance, and host adaptation in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6423), 181–187. <https://doi.org/10.1126/science.aau5238>
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., & Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Current Opinion in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
- KA, T., & PN, R. (2017). An *ompR-envZ* Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075. *Journal of Bacteriology*, *199*(3).
<https://doi.org/10.1128/JB.00705-16>
- Kay, E., Humair, B., Dénervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., ... Haas, D. (2006). Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in

- Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 6026–6033.
<https://doi.org/10.1128/JB.00409-06>
- Kenney, L. J. (2010). How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 168–176.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.013>
- KM, W., G, C.-O., BS, T., S, D.-N., JY, C., S, L., ... K, R. (2019). Mucin glycans attenuate the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in infection. *Nature Microbiology*, 4(12). <https://doi.org/10.1038/S41564-019-0581-8>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Steven Hill, D., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Kozubek*, A., & Tyman, J. H. P. (1998). Resorcinolic Lipids, the Natural Non-isoprenoid Phenolic Amphiphiles and Their Biological Activity.
<https://doi.org/10.1021/CR970464O>
- Lalaouna, D., Fochesato, S., Sanchez, L., Schmitt-Kopplin, P., Haas, D., Heulin, T., & Achouak, W. (2012). Phenotypic switching in *Pseudomonas brassicacearum* involves GacS- and GacA-dependent Rsm small RNAs. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1658–1665. <https://doi.org/10.1128/AEM.06769-11>
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. H. T., & Haas, D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: From RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*, 67(2), 241–253.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06042.x>
- Larsen, B., & Haug, A. (1971). Biosynthesis of alginate. 1. Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii* (Lipman). *Carbohydrate Research*, 17(2), 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)82536-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)82536-7)
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Défago, G., & Haas, D. (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1562–1566.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.5.1562>
- Le, O., Shen, B., Iismaa, S. E., & Burgess, B. K. (1993). *Azotobacter vinelandii* mutS:

- nucleotide sequence and mutant analysis. *Journal of Bacteriology*, 175(23), 7707–7710. <https://doi.org/10.1128/jb.175.23.7707-7710.1993>
- LeRoux, M., Kirkpatrick, R. L., Montauti, E. I., Tran, B. Q., Peterson, S. B., Harding, B. N., ... Mougous, J. D. (2015). Kin cell lysis is a danger signal that activates antibacterial pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.05701>
- Lin, L. P., & Sadoff, H. L. (1968). Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of beta-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 95(6), 2336–2343. <https://doi.org/10.1128/JB.95.6.2336-2343.1968>
- Lloret, L., Barreto, R., León, R., Moreno, S., Martínez-Salazar, J., Espín, G., & Soberón-Chávez, G. (1996). Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Molecular Microbiology*, 21(3), 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02554.x>
- López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., ... Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 670–680. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0102-7>
- López-Pliego, L., Mena-Muñoz, G., Terán-Melo, J. L., Fuentes, L. E., Núñez, C. E., & Castañeda, M. (2020). Study of the sRNA RsmY involved in the genetic regulation of the synthesis of alginate and alkyl resorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Archives of Microbiology*, 202(3), 579–589. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01769-y>
- Luis Felipe, M.-M., Soledad, M., Ramsés, G.-M., & Guadalupe, E. (2017). Unphosphorylated EIIA Ntr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 104(2). <https://doi.org/10.1111/MMI.13621>
- M, S., H, S., S, M., M, M., BE, C., T, B., ... S, V. (2008). The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. *Environmental Microbiology*, 10(7). <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01597.X>
- Maharjan, R., & Ferenci, T. (2014). Stress-induced mutation rates show a sigmoidal and

- saturable increase due to the RpoS sigma factor in *Escherichia coli*. *Genetics*, 198(3), 1231–1235. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.170258>
- Maldonado, R., Jiménez, J., & Casadesús, J. (1994). Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3911–3919. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021173>
- Mancl, J. M., Ray, W. K., Helm, R. F., & Schubot, F. D. (2019). Helix Cracking Regulates the Critical Interaction between RetS and GacS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure (London, England : 1993)*, 27(5), 785-793.e5. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.02.006>
- Mander, L. N., & Liu, H. (2010). *Comprehensive natural products II : chemistry and biology*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780080453828/comprehensive-natural-products-ii>
- Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., ... Castañeda, M. (2011). Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene *algD* by the Gac/Rsm System in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 21(3–4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>
- Marden, J. N., Diaz, M. R., Walton, W. G., Gode, C. J., Betts, L., Urbanowski, M. L., ... Wolfgang, M. C. (2013). An unusual CsrA family member operates in series with RsmA to amplify posttranscriptional responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 15055–15060. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307217110>
- Marinus, M. G., & Casadesus, J. (2009). Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation, and more. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 488–503. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00159.x>
- Martínez-Granero, F., Capdevila, S., Sánchez-Contreras, M., Martín, M., & Rivilla, R. (2005). Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 3), 975–983. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27583-0>
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M., & Filloux, A. (2011). Key two-component regulatory

- systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13(7), 1666–1681. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x>
- Miyanaga, A., Funa, N., Awakawa, T., & Horinouchi, S. (2008). Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), 871–876. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709819105>
- Miyanaga, A., & Ohnishi, Y. (2019). Phenolic Lipids Synthesized by Type III Polyketide Synthases. In *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes* (pp. 139–149). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_14
- Moreno, J., Gonzalez-Lopez, J., & Vela, G. R. (1986). Survival of *Azotobacter* spp. in Dry Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(1), 123–125. <https://doi.org/10.1128/AEM.51.1.123-125.1986>
- Moreno, S., Nájera, R., Guzmán, J., Soberón-Chávez, G., & Espín, G. (1998). Role of alternative sigma factor algU in encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 180(10), 2766–2769. <https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2766-2769.1998>
- Morris, E. R., Hall, G., Li, C., Heeb, S., Kulkarni, R. V., Lovelock, L., ... Searle, M. S. (2013). Structural rearrangement in an RsmA/CsrA ortholog of *Pseudomonas aeruginosa* creates a dimeric RNA-binding protein, RsmN. *Structure (London, England : 1993)*, 21(9), 1659–1671. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.07.007>
- Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental Microbiology*, 13(12), 3128–3138. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02595.x>
- Moxon, R., Bayliss, C., & Hood, D. (2006). Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annual Review of Genetics*, 40, 307–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090442>
- Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L. P., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2015). The unphosphorylated EIIA(Ntr) protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One*, 10(2),

- e0117184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117184>
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *15*(4), 244–254. <https://doi.org/10.1159/000108658>
- P, G. (1998). Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects. *Microbiology (Reading, England)*, *144* (Pt 5). <https://doi.org/10.1099/00221287-144-5-1133>
- Pacheco-Leyva, I., Guevara Pezoa, F., & Díaz-Barrera, A. (2016). Alginate biosynthesis in *azotobacter vinelandii*: Overview of molecular mechanisms in connection with the oxygen availability. *International Journal of Polymer Science*, *2016*, 11–13. <https://doi.org/10.1155/2016/2062360>
- Parkins, M. D., Ceri, H., & Storey, D. G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, *40*(5), 1215–1226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02469.x>
- Parkinson, J. S., & Kofoed, E. C. (1992). Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins. *Annual Review of Genetics*, *26*(1), 71–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.000443>
- Pflüger-Grau, K., & Görke, B. (2010). Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in Microbiology*, *18*(5), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.003>
- Phillips, Z. N., Husna, A.-U., Jennings, M. P., Seib, K. L., & Atack, J. M. (2019). Phasevarions of bacterial pathogens - phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction-modification systems. *Microbiology (Reading, England)*, *165*(9), 917–928. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000805>
- Phillips, Z. N., Tram, G., Seib, K. L., & Atack, J. M. (2019). Phase-variable bacterial loci: how bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochemical Society Transactions*, *47*(4), 1131–1141. <https://doi.org/10.1042/BST20180633>
- R, D., & M, I. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(1). [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01503-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01503-0)
- Records, A. R., & Gross, D. C. (2010). Sensor kinases RetS and LadS regulate

- Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3584–3596. <https://doi.org/10.1128/JB.00114-10>
- Reimann, C, Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., & Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular Microbiology*, 24(2), 309–319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3291701.x>
- Reimann, Cornelia, Valverde, C., Kay, E., & Haas, D. (2005a). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 276–285. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.276-285.2005>
- Reusch, R. N., & Sadoff, H. L. (1979). 5-n-Alkylresorcinols from encysting *Azotobacter vinelandii*: isolation and characterization. *Journal of Bacteriology*, 139(2), 448–453. <https://doi.org/10.1128/JB.139.2.448-453.1979>
- Reusch, R. N., & Sadoff, H. L. (1983a). Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature*, 302(5905), 268–270. <https://doi.org/10.1038/302268a0>
- Reyes Nicolau, J. I. (2018). Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en *Azotobacter vinelandii*. Retrieved from <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/7644>
- Richardson, M., & Khosla, C. (1999). Structure, Function, and Engineering of Bacterial Aromatic Polyketide Synthases. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 473–494. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00019-9>
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., & Foglino, M. (2000). Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology*, 8(11), 498–504. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01833-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01833-3)
- Romero, Y., Guzmán, J., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Vences-Guzmán, M. Á., Castañeda, M., ... Segura, D. (2016). The GacS/A-RsmA Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PloS One*, 11(4), e0153266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153266>

- Romero, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., & Segura, D. (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, *195*(8), 1834–1844. <https://doi.org/10.1128/JB.01946-12>
- S, M., DJ, S., P, S., CR, M., SW, C., & MJ, F. (2010). Construction of an rsmX co-variance model and identification of five rsmX non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *RNA Biology*, *7*(5). <https://doi.org/10.4161/RNA.7.5.12687>
- Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., & Buchrieser, C. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*, *72*(3), 741–762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06677.x>
- Sánchez-Contreras, M., Martín, M., Villacieros, M., O’Gara, F., Bonilla, I., & Rivilla, R. (2002). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, *184*(6), 1587–1596. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1587-1596.2002>
- Sánchez-Romero, M. A., & Casadesús, J. (2020). The bacterial epigenome. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0286-2>
- Sánchez Cuapio, Z. (2012). *Estudio de la cascada de regulación GacS/RetS/LadS/GacA-rsmZ en Azotobacter vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).
- Satou, R., Miyanaga, A., Ozawa, H., Funa, N., Katsuyama, Y., Miyazono, K., ... Horinouchi, S. (2013). Structural basis for cyclization specificity of two *Azotobacter* type III polyketide synthases: a single amino acid substitution reverses their cyclization specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(47), 34146–34157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487272>
- Segura, A., Hurtado, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2004). Transcriptional phase variation at the flhB gene of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is involved in response to environmental changes and suggests the participation of the flagellar export system in solvent tolerance. *Journal of Bacteriology*, *186*(6), 1905–1909. <https://doi.org/10.1128/jb.186.6.1905-1909.2004>
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M., & Espín, G. (2009).

- Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *Journal of Bacteriology*, 191(9), 3142–3148.
<https://doi.org/10.1128/JB.01575-08>
- Setubal, J. C., Dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L. M., ... Wood, D. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*, 191(14), 4534–4545. <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>
- Socolofsky, M. D., & Wyss, O. (1961). CYSTS OF AZOTOBACTER. *Journal of Bacteriology*, 81(6), 946–954. <https://doi.org/10.1128/JB.81.6.946-954.1961>
- SOCOLOFSKY, M. D., & WYSS, O. (1962). Resistance of the *Azotobacter* cyst. *Journal of Bacteriology*, 84(1), 119–124. <https://doi.org/10.1128/JB.84.1.119-124.1962>
- Song, C., Kidarsa, T. A., van de Mortel, J. E., Loper, J. E., & Raaijmakers, J. M. (2016). Living on the edge: emergence of spontaneous *gac* mutations in *Pseudomonas protegens* during swarming motility. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3453–3465. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13288>
- Srikhanta, Y. N., Maguire, T. L., Stacey, K. J., Grimmond, S. M., & Jennings, M. P. (2005). The phasevarion: a genetic system controlling coordinated, random switching of expression of multiple genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), 5547–5551.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501169102>
- Stasiuk, M., & Kozubek, A. (2010). Biological activity of phenolic lipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(6), 841–860. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.
<https://doi.org/10.1038/35023079>
- Tłuścik, F., Kazubek, A., & Mejbaum-Katzenellenbogen, W. (1981). Alkylresorcinols in

- rye (*Secale cereale* L.) grains. VI. Colorimetric micromethod for the determination of alkylresorcinols with the use of diazonium salt, Fast Blue B. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 50(4), 645–651. <https://doi.org/10.5586/asbp.1981.086>
- Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., & Espín, G. (2017). GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(2). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw278>
- Trzilova, D., & Tamayo, R. (2021). Site-Specific Recombination - How Simple DNA Inversions Produce Complex Phenotypic Heterogeneity in Bacterial Populations. *Trends in Genetics : TIG*, 37(1), 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.09.004>
- Two-Component Signaling Systems. (2005). In *Molecular and Cellular Signaling* (pp. 139–159). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-26015-3_7
- Ueda, A., Ogasawara, S., & Horiuchi, K. (2020). Identification of the genes controlling biofilm formation in the plant commensal *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Archives of Microbiology*, 202(9), 2453–2459. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01966-0>
- Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>
- Vafina, G. K., & Stupak, E. E. (2020). Study of the influence of external factors on the inheritance of forms of dissociants *Pseudomonas mandelii*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 548(7), 072044. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/7/072044>
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 79(2), 193–224. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14>
- Valentini, M., Laventie, B.-J., Moscoso, J., Jenal, U., & Filloux, A. (2016). The Diguanylate Cyclase HsbD Intersects with the HptB Regulatory Cascade to Control *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility. *PLoS Genetics*, 12(10), e1006354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006354>
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., & Haas, D. (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in

- Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1361–1379.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x>
- Valverde, C., Lindell, M., Wagner, E. G. H., & Haas, D. (2004). A repeated GGA motif is critical for the activity and stability of the riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25066–25074.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M401870200>
- van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V, & Lugtenberg, B. J. J. (2005a). Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 593–600. <https://doi.org/10.1128/JB.187.2.593-600.2005>
- van der Woude, M. W. (2011). Phase variation: how to create and coordinate population diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 205–211.
<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.01.002>
- Vazquez, A., Moreno, S., Guzmán, J., Alvarado, A., & Espín, G. (1999). Transcriptional organization of the *Azotobacter vinelandii* *algGXLVIFA* genes: characterization of *algF* mutants. *Gene*, 232(2), 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00119-5)
- Ventre, I., Goodman, A. L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., ... Filloux, A. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 171–176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507407103>
- Vincent, F., Round, A., Reynaud, A., Bordi, C., Filloux, A., & Bourne, Y. (2010). Distinct oligomeric forms of the *Pseudomonas aeruginosa* RetS sensor domain modulate accessibility to the ligand binding site. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1775–1786. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02264.x>
- Vincent, M. S., & Uphoff, S. (2020). Bacterial phenotypic heterogeneity in DNA repair and mutagenesis. *Biochemical Society Transactions*, 48(2), 451–462.
<https://doi.org/10.1042/BST20190364>
- Wang, B. X., Wheeler, K. M., Cady, K. C., Lehoux, S., Cummings, R. D., Laub, M. T., & Ribbeck, K. (2020). Mucin Glycans Signal through the Sensor Kinase RetS to Inhibit Virulence-Associated Traits in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biology : CB*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.088>

- Wolanin, P. M., Thomason, P. A., & Stock, J. B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), reviews3013.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-10-reviews3013>
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., ... Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3469–3478. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>
- Yan, Q., Lopes, L. D., Shaffer, B. T., Kidarsa, T. A., Vining, O., Philmus, B., ... Loper, J. E. (2018). Secondary Metabolism and Interspecific Competition Affect Accumulation of Spontaneous Mutants in the GacS-GacA Regulatory System in *Pseudomonas protegens*. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01845-17>
- Zere, T. R., Vakulskas, C. A., Leng, Y., Pannuri, A., Potts, A. H., Dias, R., ... Romeo, T. (2015). Genomic Targets and Features of BarA-UvrY (-SirA) Signal Transduction Systems. *PloS One*, 10(12), e0145035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145035>
- Zhang, Q., Xiao, Q., Xu, J., Tong, Y., Wen, J., Chen, X., & Wei, L. (2015). Effect of retS gene on antibiotics production in *Pseudomonas fluorescens* FD6. *Microbiological Research*, 180, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.005>