



UNIVERSIDAD
**PABLO^D
OLAVIDE**
S E V I L L A

Centro
Andaluz
de Biología
del Desarrollo



Caracterización del regulón de FleQ y del cambio de estilo de vida de *Pseudomonas putida*

Memoria presentada por
Antonio Leal Morales

Para optar al grado de
Doctor en Biotecnología y Tecnología Química

Tesis Doctoral dirigida por

Aroa López Sánchez

Fernando Govantes Romero

Gracias...

Aroa, por acogerme como a un hijo desde el primer momento, por confiar en mí y enseñarme con paciencia infinita todo lo que debía aprender. Por ayudarme dentro y fuera del laboratorio, y preocuparte cuando las cosas no funcionaban del todo bien. ¡Te debo unas vacaciones!

Fernan, por guiarme cada vez que andaba perdido e inspirarme la seguridad necesaria para avanzar. Por enseñarme a afrontar y resolver los problemas con inteligencia, por hacer sencillo lo más complicado.

A ambos, por haberme dado la oportunidad de teneros como ejemplo y por haber sido ese equipo perfecto que no mucha gente tiene la suerte de disfrutar a su lado.

A mis padres, por ser un apoyo incondicional en todos los aspectos imaginables antes, durante y después de esta tesis. Gracias por cuidarme y sacrificaros por mí. Esto, y tantas otras cosas, habrían sido imposible sin vosotros. A mi hermano, mis tios, mis primos y mis abuelos por hacerme sentir querido y valorado en todo momento.

A todas las personas (más de las que puedo mencionar aquí) con las que he tenido el placer de compartir laboratorio estos años: Laura Serrano y nuestra “cagada conjunta”, Rocío alias *rompepiernas* y su bate, Laura pequeña y Álvaro...nahR-Psal-nasF-miniTn7BBGm..., ¿Lisa? ¿Qué Lisa?, Inés *meeencanta*, y bueno ya sabéis...*en plan* todos. A Yuzu, por las risas y los ratitos de charla y café cuando ya quedábamos pocos ¡menos mal que apareciste! A Ali, por facilitarme la vida con su estupenda herencia. Gracias a todos por haber hecho del 240 un sitio increíble que recordaré toda mi vida.

A todos los que estuvieron en los inicios. Especialmente a Adolfo, por darme la oportunidad de empezar sin siquiera saber coger una pipeta, y a Kathy, por ayudarme a dar los primeros pasos cuando el microscopio solo era un cacharro enorme con luces y muchísimos botones.

A Micro, por todos los consejos, tanto científicos como personales. De todos vosotros me llevo un cachito y muy buenos recuerdos. Agradecer especialmente a Edu, por invertir su tiempo desinteresadamente en mí y echarme un gran cable en los últimos meses. Gracias Paqui, por valorarme como lo haces y, por supuesto, por hacerme llorar

de risa en los sofás después de cada comida, me has alegrado muchos días malos. Gracias Rubén, Inma, Elena y Guada porque, además de amigos, habéis sido unos estupendos consejeros, os voy a echar mucho de menos (aunque en el futuro volveré a recurrir a vosotros, tenedlo claro). A Inés y Amando porque sé que me tenéis especial cariño y preocupación por mí. En definitiva, gracias a todos por hacerme sentir parte de una gran familia desde el principio.

A Blanca, mi compañera de laboratorio y de vida gran parte de este tiempo. Gracias por valorarme, ayudarme y cuidarme cada uno de los segundos, por darme la fuerza y el apoyo cuando todo era negro. Sin ti no estaría escribiendo esto. Gracias por haber sido la razón de tantas cosas bonitas.

A Jebi, Agus, Rober, Albert, Buggi, Ale, Pablo y Jordi por todos los buenos ratos de desconexión necesaria en Fuengirola, es complicado encontrar amigos como vosotros. Especialmente a Adri y Sonia, por repescarme del pozo y ser mi terapia, os debo más de lo que seguramente imagináis.

A David y Álvaro porque, aunque yo pensaba que la gente de fiar no pedía bolis prestados ni llevaba aritos de coco, afortunadamente me equivocaba. Gracias por ser una fuente inagotable de consejos, de ánimo, de ayuda, de risas y de buen rollo. Sois lo mejor que me traje de Salamanca.

I would also like to thank Yanyan, Samira and Marta for treating me as a friend as soon as I arrived in the States. Thank you for making me laugh trying to pronounce words in Spanish or trying to convince me about how rich and tasty the chinese food is. I am also really grateful to Javier Buceta for giving me the opportunity to be part of his wonderful team and allowing me to know a new country and a whole new culture. I will never forget the experience and all the rewarding things I learnt in Lehigh.

Gracias a todos por la ayuda, la dedicación y la confianza que habéis depositado en mí a lo largo de este tiempo.

Índice

ÍNDICE

Página

Introducción

1. Biofilms bacterianos.....	23
1.1 Etapas del ciclo de desarrollo del biofilm bacteriano.....	23
2. Estilo de vida planctónico: el flagelo bacteriano.....	28
2.1 Estructura del flagelo.....	29
2.2 Ensamblaje del flagelo en bacterias Gram-negativas	30
2.3 Patrón de flagelación y movilidad.....	31
3. Regulación del estilo de vida.....	33
3.1 Regulación de la alternancia entre estilos de vida: di-GMPc.....	33
3.1.1 Metabolismo del di-GMPc	34
3.1.2 Efectores de di-GMPc	36
3.1.3 FleQ como efector de di-GMPc	37
3.2 Regulación del desarrollo de los biofilms bacterianos.....	38
3.2.1 Regulación de la formación de biofilm	38
3.2.2 Regulación de la dispersión del biofilm	40
3.3 Regulación de la síntesis y el ensamblaje flagelar.....	41
3.3.1 Cascadas de activación flagelar	41
3.3.2 Regulación dependiente de σ^{54} (RpoN)	43
3.3.3 Regulación dependiente de σ^{28} (FliA)	45
3.4 Control espacial y numérico del ensamblaje flagelar.....	45
4. <i>P. putida</i> como modelo para el estudio del cambio en el estilo de vida.....	48
4.1 El biofilm en <i>P. putida</i>	49
4.1.1 Ciclo de desarrollo del biofilm en <i>P. putida</i> KT2440	49
4.2 El sistema flagelar en <i>P. putida</i>	59
4.3 Regulación del cambio del estilo de vida en <i>P. putida</i>	55
Objetivos.....	57
Materiales y métodos	
1. Estirpes, plásmidos y oligonucleótidos.....	63
2. Técnicas microbiológicas.....	75
2.1 Medios y condiciones de cultivo.....	75
2.2 Conservación de las estirpes bacterianas.....	75

2.3 Transferencia de ADN a estirpes bacterianas.....	75
2.3.1 Transferencia de plásmidos por conjugación triparental	75
2.3.2 Transferencia de plásmidos por transformación	76
2.3.2.1 Electrotransformación	76
2.3.2.1.A Preparación de células electrocompetentes	76
2.3.2.1.B Electroporación	76
2.3.2.2 Transformación por choque térmico de <i>E. coli</i>	76
2.3.2.2.A Preparación de las células competentes	76
2.3.2.2.B Transformación	77
2.4 Análisis de la expresión génica.....	78
2.4.1 Ensayo β -galactosidasa	78
2.4.2 Ensayo fluorimétrico	79
2.4.2.1 Obtención de datos	79
2.4.2.2 Análisis de los datos obtenidos	79
2.5 Análisis fenotípicos.....	79
2.5.1 Ensayos de movilidad en agar blando o movilidad tipo <i>swimming</i>	79
2.5.2 Ensayos de movilidad en superficie tipo <i>swarming</i>	80
2.5.3 Ensayos de quimiotaxis	80
2.5.4 Tinción de flagelos	80
2.6 Ensayos de localización de proteínas fluorescentes.....	81
2.7 Ensayos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP).....	81
3. Técnicas moleculares.....	82
3.1 Manipulación de ácidos nucleicos.....	82
3.1.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	82
3.1.2 Extracción de ADN genómico de <i>P. putida</i> KT2442	82
3.1.3 Electroforesis de ADN	82
3.1.4 Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN	83
3.1.5 Cuantificación de ADN	83
3.1.6 Clonación de fragmentos de ADN	83
3.1.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	84
3.1.8 Mutagénesis dirigida por PCR solapante	84
3.1.9 Secuenciación	85
3.1.10 Expresión de proteínas fusionadas a fluorocromos	85
3.2 Construcción de mutantes de delección.....	86
3.2.1 Método mediado por flipasa (FRT)	86
3.2.2 Método de delección sin cicatriz	88

3.3 Clonación mediante sistema Gateway™	90
3.4 Purificación de proteínas mediante sistema IMPACT	90
3.4.1 Superproducción de proteínas	90
3.4.2 Purificación de proteínas	91
3.4.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS	91
3.5 Ensayo de retardo de movilidad en gel	92
3.5.1 Marcaje de las sondas	92
3.5.2 Ensayo de retardo de movilidad en gel	92

Resultados

1. Regulación de los genes de biofilm en <i>P. putida</i> KT2442	93
1.1 Papel de FleN en la regulación del gen <i>lapA</i> y el operón <i>bcs</i>	95
1.2 Los niveles intracelulares de di-GMPc modulan la actividad de los reguladores FleQ y FleN sobre la expresión de los genes <i>lapA</i> y <i>bcs</i>	96
1.3 La proteína moduladora FleN y el di-GMPc determinan la interacción entre FleQ y los promotores <i>P_{lapA}</i> y <i>P_{bcs}</i>	98
2. Regulación transcripcional de los genes flagelares en <i>Pseudomonas putida</i> KT2442	103
2.1 Análisis <i>in silico</i> del clúster flagelar en <i>P. putida</i> KT2442	105
2.2 La expresión del regulador principal FleQ es independiente del resto de elementos de la cascada de activación transcripcional	107
2.3 El activador transcripcional FleQ y el factor σ^{54} son necesarios para la expresión de los genes relacionados con la formación de flagelo	108
2.4 FleQ activa de forma directa la expresión de la mayoría de los promotores del clúster flagelar	110
2.5 FleN antagoniza la activación mediada por FleQ en la mayoría de los promotores que conforman el clúster flagelar	112
2.6 Los niveles de di-GMPc modifican la expresión de todos los promotores del clúster flagelar que son regulados de forma directa por FleQ	113
2.7 El activador transcripcional FleR no es esencial para la activación de ninguno de los genes flagelares en <i>P. putida</i> KT2442	115
2.8 FleR no es necesario para una correcta movilidad tipo <i>swimming</i> en <i>P. putida</i> KT2442	116
2.9 El factor de transcripción FliA es necesario para la expresión de los genes tardíos de la cascada flagelar	117

2.10 El análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras apoya los resultados experimentales.....	120
2.11 Análisis de delección del promotor <i>PflgB</i> en <i>P. putida</i> KT2442.....	121
2.12 El promotor <i>PflgB</i> presenta regiones reguladoras conservadas en diferentes especies de <i>Pseudomonas</i> ambientales	124
2.13 El sitio FleQ-3 es determinante para la expresión de <i>PflgB</i>	127
2.14 La proteína auxiliar IHF participa en la expresión del promotor <i>PflgB</i> en <i>P. putida</i> KT2440.....	129
2.15 La orientación en la hélice de ADN del sitio FleQ-3 respecto al promotor es esencial para la activación de <i>PflgB</i>	130

3. Regulación espacial y numérica del ensamblaje de los flagelos en *Pseudomonas putida* KT2442.....135

3.1 Las proteínas FlhF y FleN participan en la correcta localización y ensamblaje del cuerpo basal del flagelo.....	137
3.2 FlhF se localiza en el polo celular en <i>P. putida</i> KT2442.....	140
3.3 La localización polar de FlhF es independiente del resto de componentes flagelares.....	142
3.4 FlhF se acumula en cualquier momento del ciclo celular y su localización no requiere de la presencia del septo de división o polos celulares.....	144
3.5 FimV participa en la movilidad dependiente de flagelo en <i>P. putida</i> KT2442.....	147
3.6 La sobreexpresión de <i>fimV</i> en <i>P. putida</i> provoca la aparición de morfologías celulares aberrantes.....	149
3.7 FimV localiza en los polos celulares en <i>P. putida</i> KT2442.....	151
3.8 FliN mantiene su localización polar en ausencia de FimV.....	153
3.9 La delección de <i>fimV</i> altera la localización y la dinámica de acumulación de FlhF a lo largo del ciclo celular.....	154
3.10 La proteína ParC localiza en el polo celular y es necesaria para la correcta movilidad celular en <i>P. putida</i> KT2442.....	156
3.11 ParC participa en la correcta localización de receptores del sistema de quimiotaxis en <i>P. putida</i> KT2442.....	158
3.12 ParC altera la movilidad celular sin modificar la localización polar de FliN, FlhF o FimV.....	160
3.13 Los mutantes $\Delta parC$, $\Delta fimV$ y $\Delta flhF$ presentan defectos en la capacidad de quimiotaxis.....	163

Discusión

1. Factores implicados en la expresión de los genes relacionados con la formación del biofilm.....	165
1.1 Regulación del promotor <i>P_{lapA}</i>	165
1.2 Regulación del promotor <i>P_{bcs}</i>	168
1.3 Coordinación de la respuesta durante la formación de biofilm.....	169
2. Factores implicados en la expresión de los genes relacionados con la formación de flagelo.....	170
2.1 Regulación de la expresión del activador transcripcional FleQ (Clase I).....	170
2.2 Regulación de los genes del clúster flagelar activados por FleQ (Clase II).....	171
2.3 Genes del clúster flagelar regulados por FliA (clase III).....	174
2.4 Regulación del promotor <i>P_{flgB}</i>	175
3. Control posicional y numérico del flagelo en <i>P. putida</i> KT2442.....	177
3.1 FlhF y FleN.....	177
3.2 Papel de FimV en la localización del flagelo y el sistema de quimiotaxis.....	180
Conclusiones.....	185
Referencias.....	189
Anexos.....	219
Anexo I. Seguimiento de la trayectoria en medio líquido de la estirpe silvestre KT2442 y diferentes mutantes.....	221
Anexo II. Alineamiento de los promotores flagelares en diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>	222

Índice de tablas

Tabla 01. Estirpes bacterianas utilizadas durante la realización de este trabajo.....	63
Tabla 02. Plásmidos usados durante la realización de este trabajo.....	65
Tabla 03. Oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de este trabajo.....	71
Tabla 04. Efecto de la expresión ectópica de FleQ o FliA en el fondo mutante <i>Δclusterflagelar</i> sobre la actividad de los promotores del clúster flagelar.....	119
Tabla 05. Cambios introducidos en el promotor <i>PflgB</i> mediante mutagénesis por PCR solapante.....	127
Tabla 06. Resumen de las modificaciones introducidas para el análisis estructural de <i>PflgB_1</i>	123

Índice de figuras

Figura 01. Etapas del ciclo del biofilm bacteriano.....	24
Figura 02. Estructura flagelar en bacterias Gram-negativas.....	30
Figura 03. Representación esquemática del ensamblaje flagelar en bacterias Gram-negativas.....	32
Figura 04. Esquema del metabolismo de di-GMPc.....	35
Figura 05. Representación esquemática de la cascada de activación transcripcional de genes flagelares en <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 06. Mecanismo de activación de promotores dependientes de σ^{54}	44
Figura 07. Fenotipos asociados a la modificación de los niveles de FlhF y FleN en <i>P. aeruginosa</i>	48
Figura 08. Representación esquemática de la adhesión en <i>P. putida</i>	50
Figura 09. Esquema de una PCR solapante.....	85
Figura 10. Esquema de los pasos seguidos para la generación de mutantes de delección mediante el método mediado por flipasa.....	87
Figura 11. Esquema de los pasos seguidos para la generación de mutantes de delección sin cicatriz.....	89
Figura 12. Expresión diferencial de los genes relacionados con biofilm en diferentes fondos mutantes.....	95

Figura 13. Efecto del di-GMPc sobre los elementos reguladores FleQ y FleN en promotores relacionados con el biofilm.....	97
Figura 14. Posibles sitios de unión de FleQ a promotores relacionado con biofilm.....	99
Figura 15. Unión de FleQ a los promotores de biofilm <i>P_{lapA}</i> y <i>P_{bcs}</i>	101
Figura 16. Organización del clúster flagelar en <i>P. putida</i> KT2442.....	106
Figura 17. Expresión del promotor <i>P_{fleQ}</i> en diferentes mutantes.....	107
Figura 18. Efecto de las deleciones de FleQ y RpoN (σ^{54}) sobre la expresión de promotores relacionados con la síntesis de flagelo.....	109
Figura 19. Complementación de la movilidad tipo <i>swimming</i> en el mutante Δ <i>fleQ</i>	110
Figura 20. Efecto de la expresión ectópica de FleQ en el fondo mutante Δ <i>clusterflagelar</i>	111
Figura 21. Efecto de la deleción de <i>fleN</i> sobre la expresión de los genes relacionados con la formación del flagelo dependientes de FleQ.....	113
Figura 22. Efecto de la modificación de los niveles de di-GMPc intracelular sobre la expresión de los genes relacionados con flagelo dependientes de FleQ...	114
Figura 23. Efecto de la deleción de <i>fleR</i> sobre la expresión de los genes relacionados con la formación del flagelo dependientes de FleQ.....	116
Figura 24. Fenotipo de movilidad tipo <i>swimming</i> del mutante Δ <i>fleR</i>	117
Figura 25. Efecto de la expresión ectópica de FliA en el fondo mutante Δ <i>clusterflagelar</i>	118
Figura 26. Análisis de deleción del promotor <i>P_{flgB}</i>	123
Figura 27. Alineamiento de los 4 sitios de interacción con FleQ propuestos en la región promotora <i>P_{flgB}</i> de <i>P. putida</i> KT2440.....	125
Figura 28. Alineamiento de la región promotora de <i>flgB</i> en diferentes especies de <i>Pseudomonas</i>	126
Figura 29. Efecto de las mutaciones de los posibles sitios de unión FleQ sobre la expresión de <i>P_{flgB}</i>	128
Figura 30. Efecto de la ausencia de <i>ihf</i> sobre la expresión de <i>P_{flgB_1}</i>	130
Figura 31. Distancia relativa entre los elementos relevantes del promotor <i>P_{flgB_1}</i>	131

Figura 32. Efecto de las modificaciones estructurales sobre la expresión de <i>PflgB</i>	132
Figura 33. Movilidad tipo <i>swimming</i> , <i>swarming</i> y tinción flagelar de la estirpe silvestre y diferentes fondos mutantes relacionados con el ensamblaje flagelar.....	137
Figura 34. Localización de la proteína FliN en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$	140
Figura 35. Complementación de la movilidad tipo <i>swimming</i> de la estirpe mutante $\Delta flhF$	141
Figura 36. Localización de la proteína FlhF durante el ciclo celular.....	141
Figura 37. Localización de FlhF en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fleN$	143
Figura 38. Localización de FlhF en el mutante $\Delta fleQ$ y <i>E. coli</i> DH5 α	144
Figura 39. Localización de FlhF en células tratadas con cefsulodina de la estirpe silvestre KT2442 y el mutante $\Delta fleN$	145
Figura 40. Acumulación de FlhF en el polo celular tras fotoblanqueo.....	147
Figura 41. Efecto de la delección de <i>fimV</i> sobre la movilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i>	148
Figura 42. Complementación de la movilidad tipo <i>swimming</i> de la estirpe mutante $\Delta fimV$	149
Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de la proteína FimV en la estirpe silvestre y diferentes fondos mutantes.....	150
Figura 44. Localización de FimV en la estirpe silvestre KT2442 y los fondos mutantes $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$	151
Figura 45. Localización de FimV en células sin septo de la estirpe silvestre.....	152
Figura 46. Localización de FimV en <i>E. coli</i> DH5 α	153
Figura 47. Localización de la proteína FliN en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fimV$	154
Figura 48. Localización y dinámica de acumulación de FlhF en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fimV$	155
Figura 49. Efecto de la delección de <i>parC</i> sobre la movilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i>	157
Figura 50. Localización de ParC en la estirpe silvestre KT2442 y los fondos mutantes $\Delta fimV$, $\Delta fleN$ y $\Delta flhF$	158

Figura 51. Localización del receptor Aer1 y Aer2 en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fimV$ y $\Delta parC$	159
Figura 52. Efecto de la delección de <i>fimV</i> y <i>parC</i> sobre la localización de los receptores de quimiotaxis Aer1 y Aer2.....	160
Figura 53. Localización de las proteínas FliN, FlhF y FimV en la estirpe silvestre y el fondo mutante $\Delta parC$	161
Figura 54. Respuesta quimiotáctica de la estirpe silvestre y los diferentes mutantes estudiados.....	162
Figura 55. Modelo de regulación del promotor <i>P_{lapA}</i>	167
Figura 56. Modelo de regulación del promotor <i>P_{bcs}</i>	168
Figura 57. Modelo de regulación por FleQ y FleN de los genes relacionados con el biofilm en condiciones de alto y bajo di-GMPc.....	169
Figura 58. Regulación mediante retroalimentación negativa de los genes reguladores <i>flhF</i> , <i>fleN</i> y <i>fliA</i>	172
Figura 59. Modelo de la cascada de activación flagelar en <i>P. putida</i> KT2442.....	175
Figura 60. Modelo de la cascada de localización del aparato flagelar y de quimiotaxis en <i>P. putida</i> KT2442.....	182

ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO

- A_{420/600}**: Densidad óptica medida a 420/600 nm
- ADN**: Ácido desoxirribonucleico
- ADNe**: ADN extracelular
- AMPc**: Adenosín monofosfato cíclico
- Ap**: Ampicilina
- ARN**: Ácido ribonucleico
- ARNm**: ARN mensajero
- ARN pol.**: ARN polimerasa
- ATP**: Adenosín trifosfato
- bEBP**: *Bacterial enhancer binding protein*
- BSA**: Albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)
- Cb**: Carbenicilina
- dATP**: Desoxiadenosina trifosfato
- dCTP**: Desoxicitidina trifosfato
- DGC**: Diguanilato ciclasa
- dGTP**: Desoxiguanosina trifosfato
- di-GMPc**: Diguanilato cíclico
- DMSO**: Dimetil sulfóxido
- dNTP**: Desoxinucleótido trifosfato
- DTT**: Ditioneitol
- dTTP**: Desoxitimidina trifosfato
- EDTA**: Ácido etilendiaminotetracético
- eYFP**: Proteína fluorescente amarilla (*yellow fluorescent protein*)
- FRT**: Sitio de reconocimiento de la flipasa (*flipase recognition target*)
- g/L**: Relación gramos/litro
- GFP**: Proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)
- Gm**: Gentamicina
- HTH**: Hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*)
- IHF**: Factor de integración de hospedador (*integration host factor*)
- IPTG**: Isopropil-β-D-tiogalactósido
- Kb**: Kilobase
- Km**: Kanamicina
- LB**: Medio Luria-Bertani
- N**: A/C/G/T
- ONPG**: Orto-nitrofenil-β-galactósido

p/v: Relación peso/volumen

Pb: Par de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

PDE: Fosfodiesterasa

Poly(dIdC): Ácido poli (deoxinosinico-deoxicitidilico)

(p)ppGpp: Guanosina tetra/pentafosfato

QS: Quorum-sensing

R²: Coeficiente de determinación

Rif: Rifampicina

Rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico

sRNAs: ARNs pequeños (*small RNAs*)

T3SS: Sistema de secreción tipo 3 (*type-3 secretion system*)

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

Tc: Tetraciclina

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

UAS: *Upstream activation sequences*

v/v: Relación volumen/volumen

W: A/T

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido

σ: Factor sigma

3MB: 3-Metilbenzoato

Resumen

El ciclo de vida de la mayoría de las bacterias en la naturaleza alterna una fase móvil, que les permite colonizar nuevos nichos, y la formación de comunidades sésiles adheridas a una superficie y embebidas en una matriz polimérica denominadas biofilms. *Pseudomonas putida* es una bacteria gram-negativa móvil gracias a un penacho de flagelos polares y con capacidad para formar biofilms sobre superficies de diferente naturaleza. En respuesta a diferentes estímulos, como la carencia de nutrientes u oxígeno, *P. putida* dispersa el biofilm y recupera la movilidad flagelar para iniciar una nueva etapa planctónica. En este trabajo, se ha demostrado que la proteína FleN y los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc modulan la actividad del regulador principal FleQ y determinan el estilo de vida escogido en cada caso. Se ha descrito una cascada de activación flagelar en 3 etapas donde FleQ ejerce como activador de promotores dependientes del factor σ^{54} , mientras que FleN y el di-GMPc se encargan de inhibir esta activación. En el caso de la formación de biofilm, FleQ, de forma independiente de σ^{54} , ejerce una doble regulación positiva y negativa sobre la expresión del gen que codifica la adhesina LapA y el operón necesario para la biosíntesis de celulosa. El di-GMPc promueve un aumento de la expresión en ambos genes mientras que FleN modula la respuesta de FleQ a los niveles de este segundo mensajero. Asimismo, se ha caracterizado el papel que ejercen las proteínas FlhF y FleN sobre el patrón de flagelación en *P. putida* y se han identificado las proteínas FimV y ParC como posibles nuevos elementos implicados en este proceso. Nuestros resultados indican que existe una regulación compleja y coordinada que controla a través de FleQ, FleN y los niveles de di-GMPc, la expresión de los genes relacionados con la formación de biofilm, la síntesis de flagelo, así como la correcta flagelación en *P.putida* KT2442.

Introducción

Los ciclos de vida bifásicos, en los que los organismos exhiben marcadas diferencias entre dos estilos de vida, son un fenómeno habitual en la naturaleza. Por ejemplo, es frecuente observar organismos cuyos ciclos de vida combinan una etapa sésil o con movilidad limitada y otra móvil y dispersiva. Las zoosporas flageladas que emplean algunas algas y hongos para propagarse o la metamorfosis que llevan a cabo los insectos holometábolos son ejemplos de ello (McDougald *et al.*, 2011). Los ciclos de vida de la mayoría de las bacterias en el medio ambiente también se caracterizan por alternar entre un estilo de vida planctónico y otro sésil en el que se desarrollan comunidades microbianas asociadas a superficies conocidas como biofilms (Costerton *et al.*, 1995). La alternancia entre estos estilos de vida permite minimizar los efectos negativos de la competencia y la escasez de recursos locales y, gracias a ella, los organismos son capaces de aprovechar las variaciones naturales del hábitat (ciclos estacionales, disponibilidad de agua y nutrientes, etc...), así como de mantener una diversidad genética beneficiosa en condiciones cambiantes o de estrés (McDougald *et al.*, 2011).

1. Biofilms bacterianos

Aunque en muchos casos la percepción que tenemos de las bacterias se limita a su forma unicelular planctónica, en la naturaleza predomina una alternancia bifásica entre un estilo de vida móvil y otro sésil (Costerton *et al.*, 1987). En su etapa móvil, las bacterias localizan nuevos nichos y tienen acceso a nuevos recursos. Además, la movilidad les permite alejarse de condiciones desfavorables en caso de ser necesario. Durante la etapa sésil, se desarrollan comunidades cooperativas conocidas como biofilms, que se encuentran asociadas a superficies bióticas o abióticas y embebidas en una matriz extracelular autogenerada (Costerton *et al.*, 1995). La habilidad inherente que presentan las bacterias para colonizar ambientes y nichos diversos reside en su capacidad para formar estas comunidades. Los biofilms bacterianos proporcionan un amplio abanico de ventajas para sus integrantes. Su propia naturaleza genera un ambiente de protección frente a diferentes factores estresantes del ambiente como la luz ultravioleta o la deshidratación, o frente a los antibióticos en el ámbito clínico (Flemming & Wingender, 2010). Además, suponen una excelente plataforma para el intercambio de nutrientes y metabolitos, lo que potencia relaciones sintróficas y procesos de transferencia horizontal de genes entre sus integrantes (McDougald *et al.*, 2011; Monds & O'Toole, 2009). Las propiedades mecánicas del biofilm le confieren resistencia frente a fuerzas de cizallamiento o de arrastre, haciendo posible el establecimiento de comunidades microbianas en ambientes, a priori, poco propicios como corrientes de agua, tuberías o plantas de producción de alimentos (Jäger-Zürn & Grubert 2000; Stoodley *et al.* 2002).

Muchos de los beneficios aportados por el biofilm bacteriano deben atribuirse a la extraordinaria complejidad de las comunidades que lo componen. En estas, las bacterias se diferencian y especializan hasta formar una estructura idónea para su crecimiento. Muchos autores asemejan estos procesos de diferenciación a los que tienen lugar en organismos pluricelulares (Monds & O'Toole, 2009; Stoodley *et al.*, 2002b).

1.1 Etapas del ciclo de desarrollo del biofilm bacteriano

El ciclo del biofilm discurre secuencialmente a lo largo de 4 etapas conocidas como adhesión, proliferación, maduración y dispersión (Fig. 01) (Stoodley *et al.*, 2002b). El ciclo de desarrollo se reinicia tras la dispersión del biofilm, que consiste en la disolución programada de la comunidad que permite a sus integrantes, o a parte de ellos, retornar a la vida planctónica para colonizar nuevos nichos (O'Toole *et al.*, 2000; Monds & O'Toole, 2009)

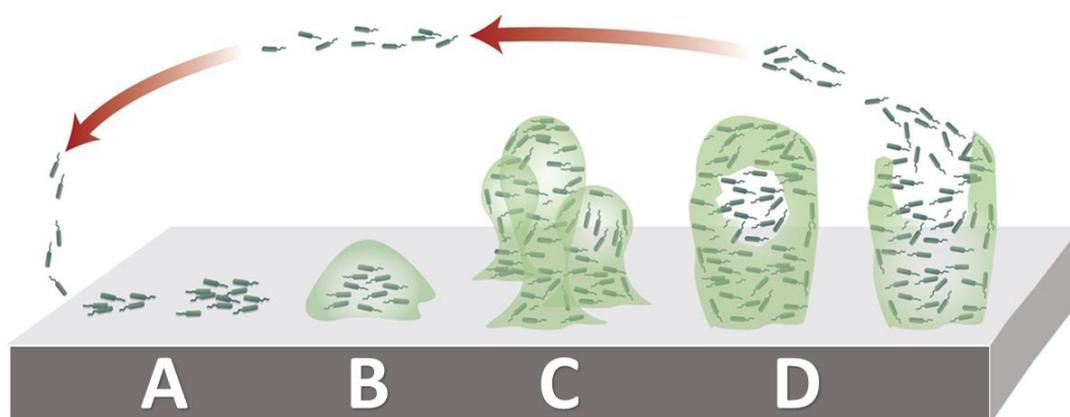


Figura 01. Etapas del ciclo del biofilm bacteriano. A) Adhesión B) Proliferación y formación de microcolonias C) Maduración D) Dispersión del biofilm. Tras la dispersión, las células recuperan la movilidad e inician una nueva etapa planctónica para colonizar nuevas superficies. Adaptado a partir de (Stoodley *et al.*, 2002b).

A. Adhesión. La unión a una determinada superficie requiere de un transporte, ya sea activo o pasivo, de la bacteria hasta la superficie. El contacto inicial genera una interacción débil que, a menudo, se rompe con facilidad. Sin embargo, para que la formación del biofilm prosiga es necesario que las bacterias queden adheridas de forma permanente al sustrato. Esta unión estable se consigue a través de una transición que tiene lugar en dos etapas: una adhesión provisional en la que las bacterias cercanas a una superficie se sienten atraídas débilmente hacia esta, y una segunda etapa en la que algunas de ellas, de manera estocástica, quedan unidas por un periodo más prolongado de tiempo (Stoodley *et al.*, 2002b) (Fig. 01 A). Las células que superan ambas etapas acaban formando una monocapa de células adheridas al sustrato de manera permanente (Karatan & Watnick, 2009).

Entre las estructuras bacterianas que colaboran en la etapa de adhesión inicial, el flagelo suele ser la más relevante. A pesar de que las bacterias aflageladas llegan hasta las superficies por medio del movimiento browniano y la propia gravedad (Boks *et al.*, 2008), la movilidad generada por el flagelo es la forma más sencilla y efectiva de vencer las fuerzas de repulsión superficial (Fletcher, 1996). Además de su papel como propulsor, al flagelo se le atribuyen importantes funciones en la detección de la propia superficie y la iniciación del programa genético que lleva a la adhesión. Por ejemplo, en *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, la ralentización en la rotación del flagelo debida al contacto con una superficie, activa la expresión de genes implicados en adhesión (Lauriano *et al.*, 2004; McCarter *et al.*, 1988). En *Bacillus subtilis*, también se ha descrito el papel del flagelo como mecanosensor de superficies, lo que podría indicar que se trata de un

mecanismo conservado en diferentes grupos de bacterias flageladas (Cairns *et al.*, 2013). Tras vencer las fuerzas de repulsión y contactar con la superficie, comienza la síntesis de adhesinas específicas que se encargan de estabilizar la interacción (Hinsa *et al.*, 2003). Es el caso de la proteína LapA, descrita inicialmente en *Pseudomonas fluorescens* (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), o la adhesina PGA en *Escherichia coli* (Agladze *et al.*, 2005; Hinsa *et al.*, 2003). En muchas ocasiones, estas adhesinas tienen una importancia capital en el proceso y su ausencia provoca una incapacidad total para formar biofilms (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Hinsa *et al.*, 2003).

B. Proliferación. La proliferación de las células unidas a la superficie trae consigo la aparición de pequeñas agrupaciones bacterianas, llamadas microcolonias (Karatan & Watnick, 2009). En la formación de microcolonias también es habitual la redistribución de las células mediante eventos de movilidad en superficie, así como el reclutamiento de células procedentes del medio circundante (Stoodley *et al.*, 2002a). Durante esta etapa, la movilidad y la síntesis flagelar cesan, dando lugar a descendientes aflagelados. A medida que aumenta el número de bacterias en la microcolonia, se hace necesario que las células sean capaces de unirse entre sí, y no únicamente a la superficie (Sauer *et al.*, 2002). Sin embargo, la carga negativa de la superficie bacteriana a menudo impide la interacción entre células. Para neutralizar estas cargas, una de las soluciones más recurrentes en la naturaleza es la síntesis de una matriz extracelular adhesiva que las englobe y mantenga unidas a las bacterias (Flemming & Wingender, 2010). La composición de la matriz extracelular, las condiciones (humedad, temperatura, etc...) e incluso las fuerzas que actúan sobre el biofilm difieren según las especies y el nicho. Aunque, como norma general, en los biofilms bacterianos predominan los polisacáridos, seguidos de proteínas, ADN con función estructural y lípidos (Flemming & Wingender, 2010).

La diversidad y función de los polisacáridos presentes en la matriz también es muy amplia. En *Pseudomonas aeruginosa*, los polisacáridos Psl (*Polysaccharide synthesis locus*), Pel (*Pellicle formation*) y el alginato son los mayoritarios y resultan fundamentales para el establecimiento de las microcolonias en las primeras etapas del biofilm, así como para la estabilidad del biofilm maduro (Ghafoor *et al.*, 2011). Por su parte, en algunos grupos de enterobacterias y otros miembros de la familia *Pseudomonadaceae*, la celulosa bacteriana constituye el elemento principal (Zogaj *et al.*, 2008). También se han descrito compuestos específicos como el polisacárido OSP (*O-specific polysaccharide*) en *V. cholerae*, que le permiten resistir el ataque del sistema inmunitario durante la colonización del intestino (Baranova *et al.*, 2018).

Introducción

En el caso de las proteínas de la matriz, las más abundantes son las enzimas degradadoras de biopolímeros solubles como los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos, e insolubles como la celulosa o la quitina (Wingender, J., 2002). De esta forma, la matriz extracelular actúa a modo de sistema digestivo externo, degradando polímeros complejos para generar moléculas más sencillas que puedan ser fácilmente incorporadas y usadas como fuente de energía por los integrantes del biofilm (Flemming & Wingender, 2010). Un segundo grupo de proteínas cumple una función estructural, bien actuando como nexo entre la superficie bacteriana y el resto de la matriz extracelular, o bien generando puentes y uniones entre elementos de la propia matriz. Este es el caso de la proteína CdrA de *P. aeruginosa*, que agrega entre sí moléculas del polisacárido Psl aportando robustez a la matriz (Borlee *et al.*, 2010).

Otro de los componentes habituales en la matriz del biofilm es el ADN extracelular (ADNe). A pesar de que durante mucho tiempo fue considerado un material residual procedente de las células lisadas, en la actualidad se considera una parte integral de la matriz, siendo secretado de forma activa por las células (Wingender *et al.*, 1999). Su abundancia y el papel que juega en el mantenimiento del biofilm varía mucho dependiendo de la especie. En *P. aeruginosa*, el ADNe actúa como un importante conector intercelular de forma que la adición de ADNasas inhibe la formación del biofilm (Whitchurch, 2002; Yang *et al.*, 2007). En otras especies, como el patógeno humano *Staphylococcus epidermidis*, su papel en el mantenimiento del biofilm parece secundario (Izano *et al.*, 2008).

Los lípidos más habituales en la matriz son los fosfolípidos y los glicolípidos procedentes de las membranas celulares (Conrad *et al.*, 2003). Sin embargo, se han descrito casos donde la presencia de lípidos específicos en la matriz resulta fundamental en el modo de vida de la bacteria. Sirvan como ejemplo los lipopolisacáridos que permiten a *Thiobacillus ferrooxidans* adherirse a la superficie de la pirita (Sand & Gehrke, 2006) o los lípidos W1, W2 y W3 secretados por *Serratia marcescens* con el objetivo de disminuir la tensión superficial de la matriz y facilitar la diseminación del biofilm (Matsuyama & Nakagawa, 1996).

C. Maduración. La maduración del biofilm implica cambios estructurales que van más allá de la proliferación celular. En *P. aeruginosa*, las células que conforman el biofilm maduro muestran diferencias de 6 o más veces en los niveles de expresión de alrededor de 800 genes en comparación con células procedentes de un cultivo planctónico (Sauer *et al.*, 2002). Durante esta etapa tienen lugar procesos de migración y reestructuración del biofilm (Stoodley *et al.*, 2002b). Las agrupaciones de bacterias que comienzan a formarse

durante la proliferación alcanzan sus proporciones máximas en esta etapa, pudiendo generar características estructuras tridimensionales como las estructuras en forma de seta que se generan en el biofilm maduro de *P. aeruginosa* (Lawrence *et al.*, 1991). Atravesando estas estructuras se localizan canales y espacios huecos que facilitan la distribución de los nutrientes y el oxígeno a la vez que evitan la acumulación de los desechos (de Beer *et al.*, 1994). A pesar de ello, la formación de gradientes es un fenómeno habitual en esta etapa. Estos gradientes (temperatura, pH, nutrientes, disponibilidad de oxígeno, etc...) fomentan la aparición de zonas con características fisico-químicas muy diferenciadas dentro del biofilm conocidas como micronichos. Por este motivo, los biofilms maduros son considerados estructuras muy complejas y heterogéneas donde es posible encontrar células con diferentes patrones de expresión, morfología, fenotipo o metabolismo (Monds & O'Toole, 2009; Sauer *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1998). Estas diferencias entre las células que constituyen el biofilm maduro se han estudiado en microorganismos como *B. Subtilis*, donde las células que mantienen unida la estructura mediante la síntesis de polisacáridos aparecen formando islas principalmente en la zona media y basal del biofilm, mientras que las células que ocupan la parte superior inician el programa de esporulación (Vlamakis *et al.*, 2008). Igualmente, se observan células que sintetizan el flagelo y recuperan la movilidad en el biofilm maduro de *P. aeruginosa*, dando lugar a características cavidades en el seno de la estructura (Sauer *et al.*, 2002). A menudo, la heterogeneidad de los biofilms maduros se relaciona con estrategias de minimización de riesgos (*bet hedging*), donde subpoblaciones con diferentes fenotipos conviven y protegen al biofilm de las condiciones cambiantes (Boles *et al.*, 2004).

D. Dispersión. El desprendimiento fortuito o por erosión de ciertas partes del biofilm es un fenómeno habitual en la naturaleza (Davies, 2011). A diferencia de este, el proceso de dispersión mediante el cual ciertas células recuperan su movilidad y vuelven al estilo de vida planctónico es un proceso activo y regulado genéticamente en las bacterias. En especies como *P. aeruginosa*, *Pseudomonas tunicata* o *V. cholerae*, el proceso de dispersión activa del biofilm va precedido por eventos de muerte celular y posterior lisis en subpoblaciones del interior del biofilm maduro (Webb *et al.*, 2003a; Webb *et al.*, 2003b). La lisis celular libera al medio los nutrientes necesarios para que otra subpoblación de bacterias active los programas genéticos de dispersión, recupere la movilidad y salga del biofilm de manera coordinada por puntos de dispersión o evacuación (Purevdorj-Gage *et al.* 2005). La dispersión activa del biofilm también puede ocurrir en cualquiera de las etapas previas del ciclo como respuesta a diferentes estímulos o cambios en las condiciones ambientales (Kim & Lee, 2016; Kjelleberg *et al.*, 2015). El

Introducción

exceso o la limitación de determinados nutrientes, la falta de oxígeno, las fluctuaciones en el pH o los cambios en la temperatura son los factores de dispersión más comunes, aunque también se han descrito otros como la alta densidad celular, mediados por mecanismos específicos como los sistemas de *quorum-sensing* o la secreción de compuestos como ácidos grasos, D-aminoácidos u óxido nítrico al medio (Kolodkin-Gal *et al.*, 2010; Kjelleberg *et al.*, 2015). Sin embargo, dada la diversidad bacteriana y la especificidad de los nichos, se han identificado factores de dispersión exclusivos de determinadas especies como las señales producidas por las células del epitelio intestinal durante la infección por *Vibrio vulnificus* (Kim *et al.*, 2013).

Además de recuperar la movilidad, los procesos de dispersión activa requieren de la participación de otra serie de actividades que permitan a las bacterias abandonar el biofilm. La participación del sistema de quimiotaxis, estrechamente ligado al funcionamiento flagelar, es fundamental en este proceso. En especies como *Helicobacter pylori*, los autoinductores secretados por las propias células al medio generan una fuerte quimiotaxis negativa que lleva a las bacterias a desplazarse fuera del biofilm. Por este motivo, los mutantes defectivos en quimiotaxis forman un biofilm estructuralmente diferente al de la estirpe silvestre (Anderson *et al.*, 2015). Otro de los procesos habituales durante la dispersión es la secreción de enzimas degradadoras de los elementos de la matriz. En *P. aeruginosa*, la dispersión del biofilm está mediada por la secreción de alginasas degradadoras de alginato, principal polímero de la matriz extracelular en esta especie, así como ADNasas exógenas que se encargan de degradar el ADN extracelular que cumple funciones estructurales (Boyd & Chakrabarty, 1994; Whitchurch, 2002). Las adhesinas específicas también son objeto de degradación. En *Staphylococcus aureus*, el sistema de *quorum-sensing* agr regula la síntesis y secreción de proteasas que degradan adhesinas específicas (Boles & Horswill, 2008). En muchas especies de *Pseudomonas*, existen varias vías que promueven la secreción de la proteasa LapG, encargada de degradar la adhesina principal LapA (Gjermansen *et al.*, 2010).

2. Estilo de vida planctónico: el flagelo bacteriano

A pesar de ser procesos energéticamente muy costosos, la ventaja evolutiva que ofrecen la movilidad y la quimiotaxis para los microorganismos es evidente. Esto se refleja en el hecho de que tanto arqueas, bacterias como células eucariotas han desarrollado, mediante evolución convergente, estructuras que les permiten desplazarse por el medio (Khan & Scholey, 2018). En bacterias, el flagelo constituye el principal órgano de propulsión para la movilidad tipo *swimming* en medios acuosos y de tipo *swarming* en

superficies semisólidas. De igual manera, se le atribuyen funciones relacionadas con la virulencia, la colonización o la adhesión a superficies o tejidos (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013).

2.1 Estructura del flagelo

El flagelo es una estructura supramolecular conformada por más de 30 proteínas bien conservadas en la mayoría de los grupos bacterianos. Las subunidades que lo constituyen se ensamblan formando 2 elementos principales: el cuerpo basal y las estructuras axiales (Imada, 2018). El cuerpo basal se encuentra embebido y fijado a la membrana mientras que las estructuras axiales incluyen componentes mayoritariamente extracelulares que se distancian hasta 20 μm de la superficie bacteriana. En bacterias Gram-negativas, el cuerpo basal está constituido por 3 anillos, denominados anillo C, con localización citoplasmática, anillo MS, localizado en la membrana interna, y anillo LP, que se extiende desde el peptidoglicano a la membrana externa. Asociado al anillo C, en la parte más basal de la estructura, encontramos el sistema de secreción de tipo 3 específico de proteínas flagelares (FT3SS), que permite regular de forma precisa y coordinada la exportación de las subunidades necesarias para el ensamblaje de las estructuras más distales (Minamino *et al.*, 2008) (Fig. 02). En conjunto, los anillos C y MS constituyen una estructura con capacidad para girar sobre sí misma conocida como rotor flagelar (Francis *et al.*, 1994). El rotor flagelar interacciona con los estatores, estructuras inmóviles ancladas al peptidoglicano que constituyen el punto de fijación sobre el que gira el rotor (Chun & Parkinson, 1988; Khan *et al.*, 1988). La interacción entre ambas genera la torsión necesaria para la rotación del flagelo gracias a la fuerza motriz generada por el paso de protones a través de canales transmembrana presentes en los estatores (Blair & Berg, 1988; Manson *et al.*, 1977). Por este motivo, el par rotor-estator también es conocido como motor flagelar. El motor flagelar es capaz de cambiar el sentido de giro gracias a la interacción de proteínas del sistema de quimiotaxis con componentes del anillo C, por lo que a esta estructura se la conoce también como conmutador flagelar (Yamaguchi *et al.*, 1986; Sarkar *et al.*, 2010). Conectando el motor flagelar y los componentes más externos encontramos una estructura cilíndrica y hueca denominada barra que actúa como eje de transmisión de la rotación hacia el resto de estructuras (Kubori *et al.*, 1992). Envolviendo esta estructura a modo de recubrimiento a lo largo de su paso a través del peptidoglicano y la membrana externa se localiza un anillo constituido por lipoproteínas denominado anillo LP. La barra actúa como nexo entre el cuerpo basal y las estructuras axiales, constituidas por el gancho y el filamento (Imada, 2018). El gancho es la primera estructura flagelar netamente extracelular, y presenta una estructura curvada y flexible encargada

Introducción

de transmitir la rotación al filamento, que tiene una estructura helicoidal alargada que se extiende a lo largo de la parte más distal del sistema, cuyo movimiento genera la propulsión necesaria para el desplazamiento (Fig. 02).

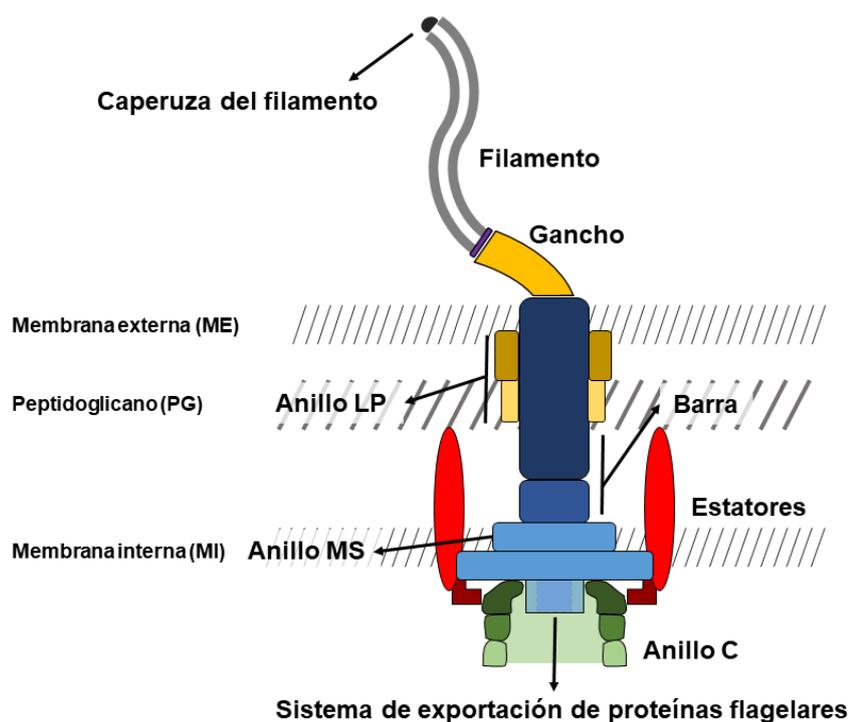


Figura 02. Estructura flagelar en bacterias Gram-negativas. Representación esquemática de las partes esenciales que constituyen un flagelo en bacterias Gram-negativas. A excepción de los estatores y el anillo LP, el resto de los componentes son exportados desde el citoplasma a través del sistema de exportación.

2.2 Ensamblaje del flagelo en bacterias Gram-negativas

El ensamblaje flagelar (Fig. 03) se inicia con la formación del anillo MS en la membrana interna (Fig. 03 A). Este proceso ocurre de forma independiente y no requiere del ensamblaje de elementos estructurales previos (Katayama *et al.*, 1996). No obstante, varios estudios han demostrado la interacción entre el anillo MS y componentes del sistema de exportación de proteínas flagelares, por lo que lo más probable es que ambas estructuras se inserten y ensamblen en la membrana de forma coordinada y secuencial (Fig. 03 B) (McMurry *et al.*, 2004). Alrededor del sistema de exportación se ensambla el anillo C (Fig 03 C) que, una vez formado, permite la exportación de los componentes de la barra a través del sistema de exportación (Fig. 03 D). Dado que las estructuras distales de la barra se ensamblan más allá de la barrera que supone el péptidoglicano, es necesaria la participación de una proteína accesoria con actividad muraminidasa que facilite el ensamblaje en esta etapa (Nambu *et al.*, 1999). El anillo LP se ensambla alrededor de la barra. Dada esta localización, los elementos que lo forman no atraviesan

el sistema de secreción para su ensamblaje, sino que presentan un péptido señal en su secuencia que permite su exportación (Homma *et al.*, 1987) (Fig. 03 E). Después comienza la formación del gancho, la primera estructura flagelar netamente extracelular que se ensambla (Fig. 03 F). Cuando el gancho alcanza la longitud óptima, un mecanismo que actúa a modo de cinta métrica molecular modifica la especificidad del sistema de secreción que comienza entonces a exportar las proteínas que constituyen el filamento (Hirano *et al.*, 1994; Moriya *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2007). Las primeras proteínas que atraviesan el sistema de secreción tras el cambio de especificidad se ensamblan rápidamente y cumplen la función de nexo entre el gancho y el filamento. Posteriormente, se incorporan una a una las subunidades de flagelina (FliC) al filamento en formación (Fig. 03 G). El ensamblaje del filamento es el mayor reto logístico de todo el proceso, tanto por el número de subunidades de flagelina implicadas (alrededor de 20.000) como por la distancia a la que es necesario transportarlas. A diferencia del gancho, los filamentos no presentan ningún mecanismo de control de su longitud, ya que, aunque son elementos frágiles, se reensamblan rápidamente tras romperse (Macnab, 2003). De manera prácticamente simultánea a la formación del filamento, se ensamblan los estatores (Fig. 03 H). Los estatores son proteínas integrales de membrana fijadas al petidoglicano que, a pesar de ello, presentan una alta tasa de recambio y pueden ensamblarse y desensamblarse de forma dinámica (Thormann & Paulick, 2010). Resultan fundamentales para el funcionamiento flagelar aunque no son imprescindibles para el ensamblaje del resto de la estructura (Blair & Berg, 1988).

2.3 Patrón de flagelación y movilidad

El número de flagelos, así como su posición en la célula, es muy variable. Especies como *E. coli*, *B. subtilis* o *Salmonella* spp. presentan filamentos distribuidos alrededor de toda su superficie, formando un patrón conocido como flagelación peritrica. Otro grupo de bacterias localiza sus flagelos exclusivamente en el polo celular. Este tipo de flagelación se conoce como flagelación polar y se diferencian varias subcategorías. *V. cholerae* o *P. aeruginosa* exhiben un único flagelo en uno de sus polos y se engloban en el subgrupo de bacterias monotricas. En cambio, *P. putida* presenta un penacho de entre 5 y 7 flagelos en uno de sus polos y constituye un modelo de flagelación lofotrica (Harwood *et al.*, 1989). Finalmente, dentro de las bacterias con flagelación polar, también encontramos células anfitricas, con flagelos en ambos polos, como las del género *Spirillum* (Murat *et al.*, 2015).

Introducción

Independientemente de la disposición de los flagelos, en todos los casos la movilidad flagelar se encuentra estrechamente asociada a un sistema de reconocimiento y localización de compuestos químicos en el ambiente denominado quimiotaxis. La capacidad para detectar los diferentes compuestos viene determinada por la presencia de proteínas sensoras (proteínas de quimiotaxisceptoras de grupos metilo, *methyl-accepting chemotaxis proteins* o MCPs) en la membrana bacteriana. Su número y el tipo de compuestos que reconocen estas proteínas sensoras varía notablemente según la especie y parece estar directamente relacionado con la versatilidad metabólica del microorganismo en cuestión. En *Pseudomonas* spp, el número de sensores de diferente naturaleza es habitualmente superior a 25, mientras que *E. coli* únicamente posee 5 (Li & Hazelbauer, 2004; Sampedro *et al.*, 2015). En respuesta a los gradientes detectados, el flagelo mantiene o modifica su sentido de giro y, en consecuencia, altera la dirección de avance dando lugar a diferentes patrones de movimiento.

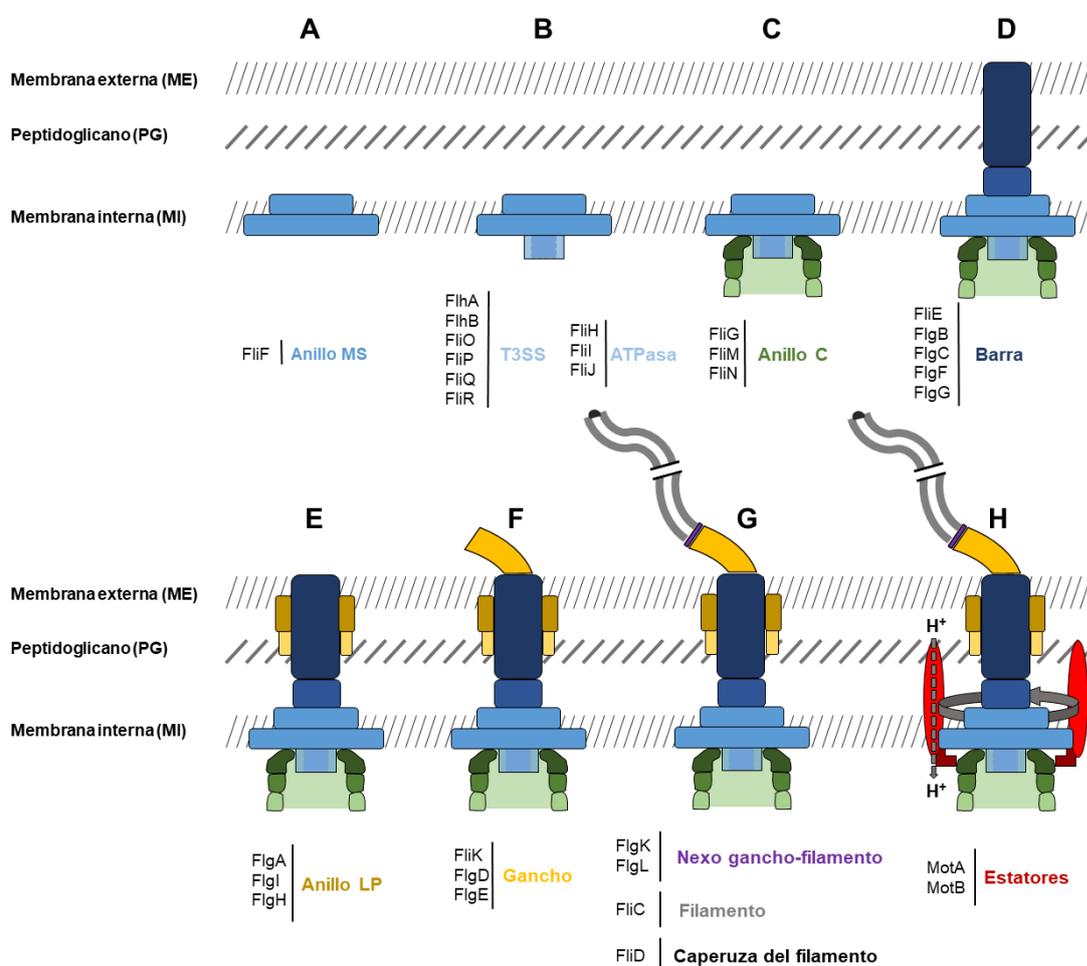


Figura 03. Representación esquemática del ensamblaje flagelar en bacterias Gram-negativas. El proceso comienza por el ensamblaje de los elementos proximales en la membrana interna y avanza de forma distal hacia el exterior celular. Los elementos de la barra, el gancho y el filamento son exportados gracias al sistema de secreción tipo 3 (T3SS). Las subunidades de los estatores y el anillo LP, que ocupan posiciones

periféricas, se exportan por medio de sistemas alternativos como el sistema Sec. Una vez constituido el sistema, el paso de protones por el canal que forman los estatores genera la suficiente energía como para girar el rotor constituido por los anillos MS y C (Imada, 2018; Macnab, 2003).

3. Regulación del estilo de vida

La formación de biofilm y la vida planctónica constituyen situaciones excluyentes de los ciclos de vida bacterianos. La transición entre ambos estados supone una modificación muy importante de los patrones de expresión génica y un gasto energético considerable (Stoodley *et al.*, 2002; Martínez-García *et al.*, 2013). Por esta razón, tanto el ciclo de desarrollo del biofilm como la síntesis del flagelo se encuentran estrictamente regulados en bacterias y esta regulación se produce necesariamente de forma coordinada.

3.1 Regulación de la alternancia entre estilos de vida: di-GMPc

Para regular la transición entre la vida planctónica y la formación de comunidades sésiles, las bacterias han desarrollado un mecanismo común basado en el diguanilato cíclico o di-GMPc. Los niveles intracelulares bajos de este segundo mensajero se encuentran frecuentemente asociados a formas de vida libre, mientras que los niveles altos se relacionan con la formación de biofilm. A pesar de que su participación en la alternancia entre estilos de vida es una de sus funciones más estudiadas, durante las últimas décadas se han descrito numerosos procesos regulados por las variaciones en los niveles de di-GMPc, como la virulencia, la producción de antibióticos o el ciclo celular (Hengge, 2009). Sin embargo, sólo recientemente han comenzado a detallarse los mecanismos de acción y las proteínas involucradas en estos fenómenos (Dahlstrom & O'Toole, 2017; Opoku-Temeng & Sintim, 2017).

El segundo mensajero di-GMPc fue descrito por primera vez en 1987 como un regulador alostérico de la celulosa sintasa en *Acetobacter xylinum* (Ross *et al.*, 1987). Sin embargo, regula procesos celulares a diferentes niveles, ya sea mediante el control de la expresión génica o por medio de mecanismos postraduccionales como el control de la actividad, la secreción o la estabilidad de determinadas proteínas (Jenal *et al.*, 2017).

Por norma general, el di-GMPc estimula la biosíntesis de adhesinas y la producción de exopolisacáridos, necesarios durante la formación de biofilm, a la vez que inhibe la expresión de los genes flagelares. De esta forma, actúa a modo de interruptor molecular regulando procesos antagónicos y excluyentes (Valentini & Filloux, 2016). En

Introducción

consecuencia, ha evolucionado un metabolismo complejo que regula de forma precisa la concentración intracelular de di-GMPc, y que se encuentra lejos de ser entendido por completo. Existen numerosas enzimas implicadas en su síntesis y degradación, y muchas otras proteínas con capacidad para responder a cambios en la concentración intracelular de este segundo mensajero.

3.1.1 Metabolismo del di-GMPc

De la síntesis de di-GMPc se encargan una clase de enzimas denominadas diguanilato ciclasas (DGC) que tienen en común la presencia de un dominio GGDEF en su estructura. Estas enzimas emplean dos moléculas de GTP como sustrato para generar una molécula de di-GMPc. Otra familia de enzimas, conocida como fosfodiesterasas (PDE), degradan esta molécula para generar pGpG, un dinucleótido lineal, que posteriormente se escinde en dos moléculas de GMP. Las fosfodiesterasas se caracterizan por presentar un dominio EAL o HD-GYP en su estructura (Fig. 04). Los genes que codifican proteínas con dominios implicados en el metabolismo de di-GMPc son omnipresentes en los genomas bacterianos. Muchas de estas proteínas tienen naturaleza modular. Combinan dominios catalíticos y reguladores que les permiten adaptar su actividad en respuesta a factores como el oxígeno molecular o la concentración de zinc (Tuckerman *et al.*, 2009; Zähringer *et al.*, 2013). El metabolismo de di-GMPc también puede acotarse espacialmente gracias a los dominios de anclaje a membrana que presentan algunas de estas proteínas (Galperin, 2004; Mills *et al.*, 2011). GÜvener y Harwood demostraron que la DGC WspR de *P. aeruginosa* era capaz de localizarse en pequeños focos en el interior celular (GÜvener & Harwood, 2007). La compartimentalización de enzimas relacionadas con el metabolismo del di-GMPc se confirmó posteriormente en este microorganismo al demostrarse la distribución asimétrica del di-GMPc en las células hijas tras la división celular (Christen *et al.*, 2010). Otro mecanismo potencial de control de la actividad de este tipo de enzimas es la inhibición por producto final. En este tipo de inhibición, descrita en la diguanilato ciclasa PleD, el di-GMPc se une alostéricamente a la enzima e inhibe su actividad (Chan *et al.*, 2004). La abundancia de proteínas relacionadas con el metabolismo de di-GMPc, así como la capacidad de cada una de ellas para responder a diferentes estímulos y mecanismos de control indican que los niveles de este segundo mensajero están sometidos a un control estricto en la célula.

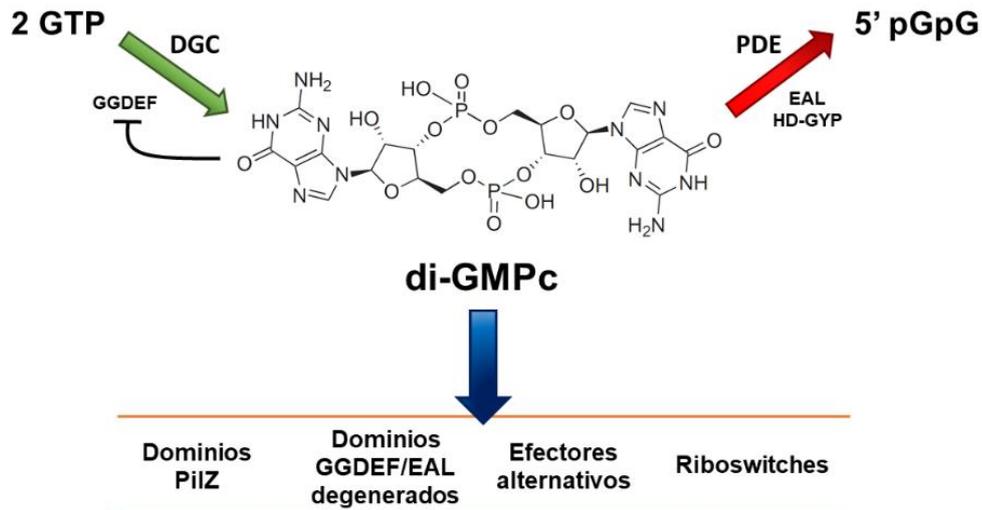


Figura 04. Esquema del metabolismo de di-GMPc. Los niveles intracelulares de di-GMPc (estructura central) se modifican gracias a la acción de 2 grupos de enzimas: diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDE). Las enzimas con actividad DGC presentan dominios GGDEF y catalizan la formación de di-GMPc empleando dos moléculas de GTP como sustrato. Las concentraciones altas de di-GMPc pueden inhibir la acción de las DGC. La degradación de di-GMPc la realizan enzimas con actividad PDE que presentan motivos EAL o HD-GYP en su estructura. El di-GMPc se hidroliza para convertirse en una molécula lineal sin actividad biológica conocida como 5' pGpG. Las moléculas de di-GMPc llevan a cabo su acción gracias a la interacción con hasta 4 familias de receptores proteicos denominados efectores de di-GMPc: proteínas con dominio PilZ, proteínas con dominios GGDEF/EAL degenerados, efectores alternativos y riboswitches. Información recopilada de (Dahlstrom & O'Toole, 2017; Hengge, 2009).

Uno de los aspectos más complejos de la señalización mediante di-GMPc es la capacidad que presentan muchas de las proteínas que responden a este segundo mensajero, también denominadas proteínas efectoras, para detectar pequeñas variaciones en los niveles de di-GMPc o activarse únicamente en un determinado rango de concentraciones. Para detectar este tipo de cambios, las proteínas efectoras presentan diferentes grados de afinidad por el di-GMPc. En *Salmonella enterica*, los efectores YcgR y BcsA, relacionados con la movilidad flagelar y la síntesis de celulosa, respectivamente, mostraron diferencias de afinidad por el di-GMPc superiores a 40 veces (Pultz *et al.*, 2012). Estas diferencias de afinidad permiten a la bacteria establecer umbrales de concentración en los que únicamente algunos de los efectores se encuentran activos. Otra característica habitual en los efectores es la presencia de múltiples sitios de unión a di-GMPc. El reconocimiento de varios sitios con diferentes afinidades por el di-GMPc permite a las proteínas actuar a modo de filtro y mostrarse activas únicamente en determinados rangos de concentración (Pultz *et al.*, 2012).

Además de las estrategias que permiten controlar los efectos de la concentración de di-GMPc intracelular sobre los efectores, también se han descrito mecanismos de interacción puntual en los que determinadas DGC/PDE interactúan de forma específica con efectores para modificar su actividad. Un ejemplo de esta interacción lo encontramos en la proteína RpfG de *Xanthomonas axonopodis*, implicada en la regulación mediante *quorum-sensing*, capaz de interactuar de forma directa con varias PDE (Andrade *et al.*, 2006) o la proteína LapD en *P. fluorescens*, que además de regular la actividad de la proteasa LapG, promueve la actividad de la DGC GcbC (Dahlstrom *et al.*, 2016).

3.1.2 Efectores de di-GMPc

El di-GMPc presenta una extraordinaria diversidad estructural. Se trata de una molécula flexible que puede compactarse o expandirse, e interactuar en forma de monómero, dímero e incluso tetramero (Chou & Galperin, 2016; Tschowri *et al.*, 2014). Esta heterogeneidad estructural explica la existencia de una amplia gama de efectores a los que estas moléculas se unen para llevar a cabo su función. Estos efectores de di-GMPc pueden ser clasificados en 4 familias: proteínas con dominio PilZ, proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados, efectores alternativos y *riboswitches* (Schirmer & Jenal, 2009; Sudarsan *et al.*, 2008) (Fig. 04).

1) Dominios PilZ. Las proteínas con dominio PilZ fueron los primeros efectores de di-GMPc que se describieron y constituyen el grupo más amplio y estudiado en la actualidad. Entre los representantes más característicos de este tipo de proteínas encontramos elementos constituyentes de la celulosa sintasa como BcsA de *G. xylinus* (Weinhouse *et al.*, 1997) o proteínas encargadas de regular la funcionalidad del motor flagelar en respuesta a di-GMPc como DgrA en *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2007) o YcgR en *E.coli* (Ryjenkov *et al.*, 2006).

2) Dominios degenerados. Otra familia de efectores bien caracterizada es la que constituyen los dominios GGDEF y EAL catalíticamente inactivos. A pesar de que en muchas ocasiones los dominios han divergido tanto que no resulta sencillo reconocer su secuencia, aún es posible encontrar en los genomas secuencias que codifican proteínas con dominios implicados en el metabolismo del di-GMPc y que han perdido su actividad catalítica, pero mantienen su capacidad de unión a di-GMPc. Estos dominios degenerados pueden encontrarse en proteínas como PeID de *P. aeruginosa*, que controla la síntesis de exopolisacáridos a nivel postraduccional en función de los niveles de di-GMPc (Whitney *et al.*, 2012).

3) Riboswitches. Se trata de los efectores de di-GMPc menos estudiados. Los *riboswitches* son segmentos de ARN mensajero no codificante localizados en la región 5' UTR. Estos ARN adoptan una estructura secundaria determinada que les permite unir pequeños ligandos. La unión de estos ligandos genera un cambio conformacional que conlleva cambios en la estabilidad del ARN o en la traducción de los genes codificados aguas abajo (Hengge, 2010). Las moléculas de di-GMPc actúan como ligandos en un tipo específico de *riboswitch* conocido como GEMM (Genes for the Environment, for Membranes and for Motility, referido a genes relacionados con el ambiente, las membranas y la movilidad) (Sudarsan *et al.*, 2008; Weinberg *et al.*, 2007).

4) Efectores alternativos. Este grupo se caracteriza por no presentar en su estructura ninguno de los motivos de interacción descritos previamente. La ausencia de un motivo característico dificulta mucho la búsqueda de genes que codifiquen este tipo de proteínas en los genomas bacterianos, por lo que aún constituyen un grupo relativamente pequeño. Uno de sus miembros más estudiados es el activador transcripcional FleQ, regulador principal de la síntesis de flagelo y la formación de biofilm en *Pseudomonas* spp. (Hickman & Harwood, 2008). FleQ fue el primer factor de transcripción con capacidad de respuesta a di-GMPc descrito y abrió la puerta a la búsqueda de posibles interacciones entre los dominios con capacidad de unir nucleótidos y el di-GMPc (Schirmer & Jenal, 2009).

3.1.3 FleQ como efector de di-GMPc.

FleQ se describió como un activador de promotores dependientes de σ^{54} del grupo de las *bacterial enhancer-binding proteins* o bEBP (tratados en el apartado 3.3.2), perteneciente a la familia NtrC. En su estructura se distingue un dominio N-terminal REC divergente, un dominio central AAA⁺ con actividad ATPasa y capacidad para interactuar con el factor σ^{54} , así como un dominio C-terminal HTH de unión a ADN (Matsuyama *et al.*, 2016). Este activador se encuentra en solución formando dímeros, tetrámeros y de forma menos frecuente hexámeros y, a diferencia de otros activadores similares, su forma dimérica tiene la capacidad para hidrolizar ATP sin necesidad de formar estructuras de orden mayor (Baraquet & Harwood, 2013). Su capacidad para unir di-GMPc y modular de esta forma su actividad también es una característica diferencial en FleQ (Hickman & Harwood, 2008). A pesar de que FleQ no presenta ningún dominio de unión a di-GMPc canónico, el di-GMPc interactúa con el dominio AAA⁺ encargado de la hidrólisis de ATP, de una forma similar a la inhibición competitiva (Baraquet & Harwood, 2013). Por tanto, las concentraciones intracelulares altas de este segundo mensajero compiten con el ATP

por el sitio de hidrólisis e impiden que FleQ desarrolle la actividad ATPasa necesaria para activar la transcripción.

FleQ presenta además la capacidad para regular la expresión de promotores independientes de σ^{54} , como ocurre por ejemplo durante la expresión de algunos de los genes relacionados con la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, como *cdrA* o *pel* (Baraquet *et al.*, 2012; Baraquet & Harwood, 2016). Sin embargo, el mecanismo de acción que hace posible la activación de este tipo de promotores por medio de FleQ continua siendo una incognita.

3.2 Regulación del desarrollo de los biofilms bacterianos

La transición entre las diferentes etapas del biofilm requiere la producción secuencial de diferentes factores en respuesta a los estímulos ambientales o fisiológicos en cada momento del ciclo. La complejidad del proceso implica la existencia de una gran variedad de vías regulatorias y de transducción de señales que conecten los diferentes estímulos con las respuestas fisiológicas apropiadas (Monds & O'Toole, 2009). El dinucleótido regulador di-GMPc (Fig. 04) es el elemento regulador principal aunque existen otros mecanismos encargados de regular el paso por las diferentes etapas como los sistemas de *quorum-sensing* (QS), otros nucleótidos reguladores como el tetra- o pentafofosfato de guanosina (p)ppGpp, o los ARNs pequeños (sRNAs) de función reguladora (Fazli *et al.*, 2014), que son específicos de determinadas especies o grupos bacterianos.

3.2.1 Regulación de la formación del biofilm

El control de los niveles intracelulares de di-GMPc hace posible la integración de los estímulos externos, permitiendo a la bacteria adaptarse y responder a las condiciones en cada momento (Fazli *et al.*, 2014; McDougald *et al.*, 2011). El papel del di-GMPc en la formación de biofilm ha sido probado en numerosas especies incluyendo *P. putida*, *P. aeruginosa*, *S. entérica* o *V. cholerae* (Hengge, 2009). Durante las etapas iniciales de la adhesión en *P. aeruginosa*, se produce un incremento en la concentración intracelular de di-GMPc que inhibe al activador transcripcional FleQ e impide la expresión de los genes relacionados con la síntesis de flagelo (Baraquet & Harwood, 2013). Asimismo, en *E. coli* y otras enterobacterias, este segundo mensajero interacciona de manera directa con la proteína YcgR, que actúa como freno molecular, y produce un bloqueo funcional de la rotación del flagelo (Boehm *et al.*, 2010). La ausencia de movimiento flagelar estabiliza la

unión de la bacteria a la superficie y permite iniciar el proceso de formación de biofilm. En el patógeno *V. cholerae*, la colonización del sustrato requiere de la presencia de *pili* en la superficie bacteriana y, según ha sido descrito de forma reciente, la unión de di-GMPc a las subunidades que constituyen los *pili* promueve su ensamblaje (Jones *et al.*, 2015). En algunas ocasiones, la propia interacción con la superficie es reconocida por la bacteria como un estímulo externo. En *P. aeruginosa*, el sistema de transducción Wsp provoca un aumento en la concentración del di-GMPc intracelular de forma inmediata tras la unión inicial (Huangyutham *et al.*, 2013) lo que permite la expresión de los polisacáridos Pel y Psl, fundamentales durante el proceso de unión irreversible (Hickman & Harwood, 2008). La presencia de Psl provoca un nuevo aumento en la concentración de di-GMPc intracelular e inicia un proceso de retroalimentación positiva que lleva a una mayor producción de ambos (Irie *et al.*, 2012). El aumento de la síntesis de Psl permite la incorporación de un mayor número de células a la microcolonia en formación y colabora en la estabilización de la estructura en etapas más tardías del desarrollo (Ha & O'Toole, 2015). Además de los cambios sobre la expresión de Psl, el aumento en los niveles de di-GMPc afecta a la expresión de la adhesina específica CdrA y los transportadores asociados que la movilizan a la membrana (Borlee *et al.*, 2010). En especies como *P. fluorescens*, donde la adhesina de superficie LapA es el elemento más importante para la formación de biofilm, el di-GMPc promueve su expresión y posibilita su presencia en la superficie celular (Hinsa *et al.*, 2003).

Entre los mecanismos de regulación del biofilm específicos de determinados grupos bacterianos, los sistemas de QS son los más estudiados y sus vías de señalización han sido ampliamente descritas en microorganismos como *P. aeruginosa*, *S. aureus* o *V. cholerae* (Boles & Horswill, 2008; Chugani *et al.*, 2001; Hammer & Bassler, 2003). Estos sistemas se basan en la producción y secreción a la matriz de pequeñas moléculas señal denominadas autoinductores (AHL) que, cuando se acumulan superando una concentración umbral, son capaces de activar o reprimir la expresión de genes diana (de Kievit & Iglewski, 2000). Dado que se requiere la participación de un gran número de células, la regulación mediante QS ocurre habitualmente en las etapas tardías del desarrollo del biofilm o incluso durante la dispersión (Wolska *et al.*, 2016).

Los nucleótidos de guanina pppGpp y ppGpp, conocidos conjuntamente como (p)ppGpp, son rápidamente sintetizados en respuesta a estrés nutricional o ambiental durante un proceso denominado respuesta estricta. La respuesta estricta es una respuesta fisiológica adaptativa destinada a aumentar la supervivencia en condiciones desfavorables (Sands & Roberts, 1952). La influencia de (p)ppGpp sobre la formación de biofilm ha sido descrita en microorganismos como *V. cholerae* o *Bordetella pertussis*

donde los nucleótidos (p)ppGpp median la formación del biofilm bajo condiciones de estrés nutricional (Gjermansen *et al.*, 2005; He *et al.*, 2012; Sugisaki *et al.*, 2013).

Los ARN pequeños también juegan un papel importante en el control del biofilm en *P. aeruginosa*. En este microorganismo se han descrito fenómenos de hiperagregación y superproducción de biofilm tras la delección de los genes *retS*, *rsmY* o *rsmZ*, que codifican este tipo de ARN pequeños (Goodman *et al.*, 2004; Heurlier *et al.*, 2004). En *P. fluorescens*, el sistema de dos componentes GacA/GacS regula la expresión de los ARN pequeños RsmA y RsmE, que, a su vez, controlan la traducción del factor σ AlgU, necesario para expresar *amrZ*, cuyo producto es el encargado de reprimir la expresión del regulador principal de biofilm FleQ (Martínez-Granero *et al.*, 2012).

3.2.2 Regulación de la dispersión del biofilm

La dispersión del biofilm es un fenómeno complejo que tiene lugar gracias a la contribución de diferentes mecanismos y que se encuentra estrictamente regulado en bacterias. Entre los procesos más habituales que hacen posible la dispersión del biofilm encontramos la recuperación de la movilidad flagelar, la degradación de elementos de la matriz extracelular, la muerte celular o la producción de determinados compuestos con actividad biosurfactante, como los ramnolípidos, que facilitan la disgregación (Kim & Lee, 2016). Cada uno de estos procesos responde de forma individual a una serie de estímulos externos que son en su mayoría desconocidos y que varían dependiendo de la estirpe estudiada. Entre los factores que fomentan la dispersión del biofilm más habituales encontramos la limitación de nutrientes, de oxígeno, cambios de temperatura o pH, la presencia de óxido nítrico o la presencia de determinados compuestos químicos como surfactantes o agentes quelantes (Kim & Lee, 2016; McDougald *et al.*, 2011). Muchos de estos estímulos se traducen en cambios en la concentración intracelular de di-GMPc. Estas variaciones disparan una serie de respuestas que desembocan en la dispersión del biofilm, aunque la naturaleza de estas respuestas varía dependiendo del microorganismo en cuestión. En *P. fluorescens*, un descenso en la concentración de di-GMPc activa el sistema de proteólisis de la adhesina LapA (Gjermansen *et al.* 2005; Boyd *et al.* 2012); en *P. aeruginosa*, donde la estabilidad del biofilm recae en los exopolisacáridos de la matriz, los bajos niveles de di-GMPc inhiben la producción de estos compuestos (Boyd & Chakrabarty, 1994; Merighi *et al.*, 2007). En especies menos estudiadas, como *S. aureus* o *Streptococcus* spp. también se han descrito fenómenos de proteólisis de adhesinas específicas o superproducción de enzimas degradadoras durante la dispersión del biofilm, sin embargo, no se ha identificado un vínculo entre estos procesos y los niveles de di-

GMPc (Lee *et al.* 1996; Lister & Horswill 2014). En *E. coli*, se han descrito mecanismos alternativos de dispersión producidos por cambios en la hidrofobicidad de la membrana (Allison *et al.*, 1990) o por la activación de la dispersión mediada por la proteína reguladora CsrA, involucrada en procesos de represión catabólica (Jackson *et al.*, 2002). Aunque ambos procesos parecen *a priori* independientes de di-GMPc, la ausencia de estudios pormenorizados no permite confirmarlo.

3.3 Regulación de la síntesis y el ensamblaje flagelar

El correcto ensamblaje y funcionamiento del flagelo bacteriano requiere la expresión de más de 50 genes, incluyendo proteínas estructurales, del motor flagelar, reguladoras y del sistema de quimiotaxis (Macnab, 2003). Es necesaria por tanto una regulación temporal coordinada de decenas de genes que habitualmente ocurre de forma jerárquica a través de cascadas de regulación transcripcional. La mayoría de cascadas de activación flagelar descritas hasta la fecha tienen en común la presencia de promotores dependientes de factores σ alternativos, como σ^{54} o FliA, lo que les aporta un nivel adicional de regulación. Sin embargo, estas redes de regulación y la arquitectura de las cascadas varían considerablemente dependiendo de la especie en cuestión (Smith & Hoover, 2009).

3.3.1 Cascadas de activación flagelar

En enterobacterias, la jerarquía de transcripción de los genes flagelares se organiza en 3 niveles. Los genes que codifican el regulador principal FlhDC, cuya expresión es dependiente de σ^{70} , constituyen la clase I. En *E. coli*, la mayor parte de la síntesis flagelar se regula mediante el control de la expresión de este regulador. Entre los factores ambientales que modifican su expresión encontramos la temperatura, el pH o la osmolaridad, así como factores endógenos como los niveles de AMPc intracelular (Li *et al.*, 1993; Soutourina *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001). FlhDC activa la expresión de los genes de clase II que codifican el cuerpo basal, el sistema de exportación de proteínas flagelares, el gancho y el factor σ FliA, necesario para la expresión de los genes tardíos o de clase III (Liu & Matsumura, 1994). Algunos genes flagelares se engloban en una clase intermedia II/III dado que dependen tanto del factor σ^{70} como de FliA. Este mecanismo permite a la bacteria expresar de forma basal determinados genes al inicio del proceso y aumentar su expresión una vez superadas ciertas etapas del ensamblaje (Osterman *et al.*, 2015).

Introducción

En *C. crescentus*, el proceso de síntesis flagelar se encuentra estrechamente ligado al ciclo celular por medio del regulador CtrA, que participa tanto en la replicación del ADN como en la activación de los genes flagelares de clase II, dependientes de σ^{70} (Quon *et al.*, 1996; Laub *et al.*, 2002; Collier *et al.*, 2006). Entre los genes de clase II se encuentran el factor σ^{54} y la proteína reguladora FliD que se encargan de activar conjuntamente la expresión de los genes de clase III y IV (Brun & Shapiro, 1992; Benson *et al.*, 1994).

En *V. cholerae*, el regulador principal FlrA activa de manera excluyente la síntesis de flagelo o la virulencia (Gardel & Mekalanos, 1996). La cascada de transcripción se inicia cuando FlrA activa la expresión de los genes de clase II dependientes de σ^{54} . Entre estos genes se incluye un sistema de dos componentes denominado FlrBC, cuya proteína sensora FlrB se fosforila en respuesta a estímulos por el momento desconocidos y hace posible la expresión de los genes de clase III por medio de FlrC (Klose & Mekalanos, 1998). Durante las últimas etapas del ensamblaje, la actividad de FliA deja de estar reprimida y posibilita la expresión de los genes de clase IV.

La represión de FliA por medio del factor anti- σ FlgM durante las primeras etapas del ensamblaje es uno de los mecanismos de control más habituales en las cascadas de activación (Aldridge & Hughes, 2002). Sin embargo, se han descrito mecanismos de control adicionales característicos de diferentes grupos bacterianos, como la proteína FlIT en enterobacterias, que se encarga de reprimir la transcripción de los genes dependientes de FlhDC una vez han sido ensambladas las proteínas codificadas en los genes activados por este factor (Yamamoto & Kutsukake, 2006), o la proteína MogR en *Listeria monocytogenes*, que reprime la expresión de los genes tempranos del flagelo durante el crecimiento intracelular (Gründling *et al.*, 2004).

P. aeruginosa, la especie del género *Pseudomonas* mejor estudiada, presenta una cascada de activación génica organizada en 4 clases, con FleQ como regulador principal (Fig. 05). *fleQ* y *fliA* son los representantes de los genes de clase I. En el caso de *fleQ*, su promotor presenta la estructura típica de los promotores σ^{70} y, hasta la fecha, se han identificado a las proteínas Vfr y AlgZ como los factores que regulan su expresión (Dasgupta *et al.*, 2002; Tart *et al.*, 2006). FleQ activa la expresión de los genes de clase II, que codifican principalmente las estructuras más basales del flagelo así como las proteínas reguladoras FleN, FliF y el sistema de dos componentes FleSR, encargado de activar la transcripción de los genes de clase III (Ritchings *et al.*, 1995). Los genes de clase III están agrupados en 3 operones que codifican elementos estructurales de las etapas intermedias del ensamblaje flagelar. En las últimas etapas del ensamblaje se produce un cambio de especificidad en el sistema de exportación de proteínas flagelares

y comienza a expulsarse activamente el factor anti- σ FlgM que bloqueaba la acción de FliA (Dasgupta *et al.*, 2003). FliA se encarga de la transcripción de los genes flagelares más tardíos incluyendo la propia flagelina, los estatores que forman parte del motor flagelar y los elementos del sistema de quimiotaxis.

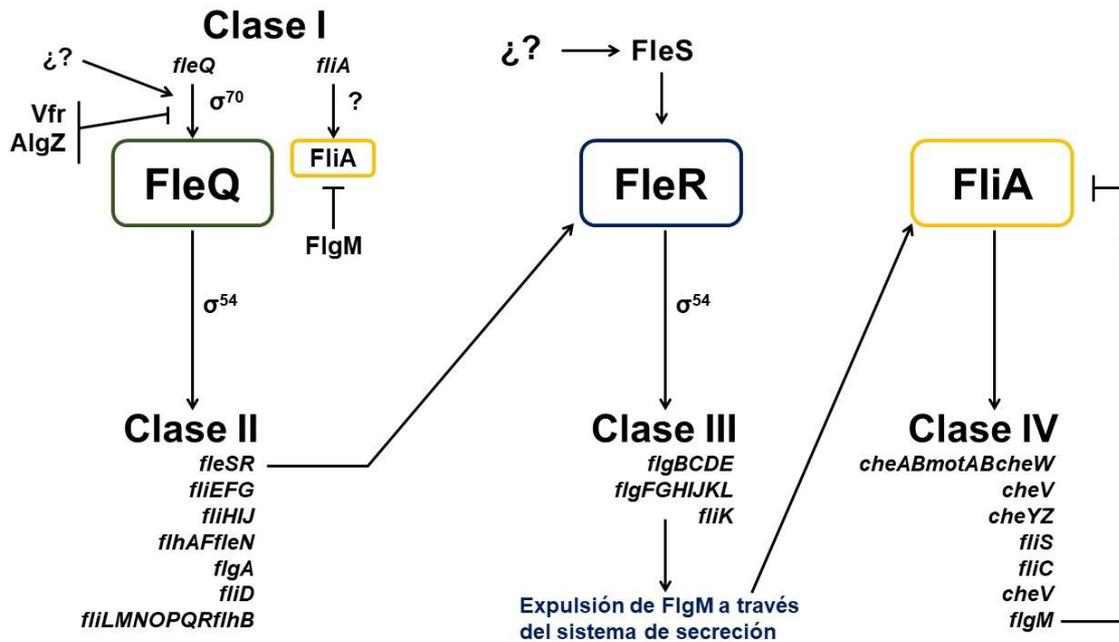


Figura 05. Representación esquemática de la cascada de activación transcripcional de genes flagelares en *P. aeruginosa*. En posición central se muestran los reguladores que dirigen el proceso: FleQ y FleR como activadores transcripcionales de promotores σ^{54} , y FliA como factor σ flagelar. Los signos de interrogación hacen referencia a factores o estímulos que no han sido descritos hasta la fecha. Los genes se organizan en las distintas clases según lo descrito en (Dasgupta *et al.*, 2003).

La participación en las cascadas de transcripción de factores σ alternativos (σ^{54} y FliA) incorpora un nivel de regulación adicional en el que participan elementos reguladores como diferentes activadores transcripcionales o factores anti- σ (Smith & Hoover, 2009).

3.3.2 Regulación dependiente de σ^{54} (RpoN)

RpoN es el único de los factores σ que no presenta homología con σ^{70} (Merrick, 1993). Por este motivo, la transcripción de genes mediada por el factor σ^{54} presenta una serie de peculiaridades que la distinguen de la transcripción de genes habitual. El factor σ^{54} reconoce y se une a secuencias fuertemente conservadas localizadas en las posiciones -12 y -24 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, en lugar de las posiciones -10 y -35 que reconocen los factores de la familia σ^{70} (Cannon *et al.*, 1995). Aunque ambos factores σ se asocian al núcleo o *core* de la polimerasa, el proceso de

Introducción

activación de los promotores se lleva a cabo mediante mecanismos de acción totalmente diferentes. La unión del factor σ^{54} junto con el resto de subunidades de la ARN polimerasa al promotor genera una unión estable pero inactiva, conocida como complejo cerrado (Fig. 06 A). La transición hacia un complejo competente para la transcripción (complejo abierto) requiere de activadores con capacidad para hidrolizar nucleótidos conocidos como bEBPs (Buck *et al.*, 2000) (Fig. 06 B). Estas proteínas reconocen secuencias consenso en regiones entre -80 y -150 pb aguas arriba del promotor, conocidas como *upstream activation sequences* o UAS (Bush & Dixon, 2012) (Fig. 06 A). Por este motivo, a menudo se hace necesaria la participación de proteínas accesorias como IHF que pliegan el ADN facilitando la interacción activador-polimerasa (Gober & Shapiro, 1992; Hoover *et al.*, 1990; Rappas *et al.*, 2007). En muchas ocasiones, los activadores se presentan como dímeros cuando están inactivos y requieren de una oligomerización para estimular la actividad ATPasa (Wikström *et al.*, 2001). En la mayoría de los casos, esta oligomerización da lugar a hexámeros, aunque también se han descrito tetrámeros, heptámeros y dodecámeros (S. Y. Lee *et al.* 2003; Sallai & Tucker 2005) (Fig. 06 B).

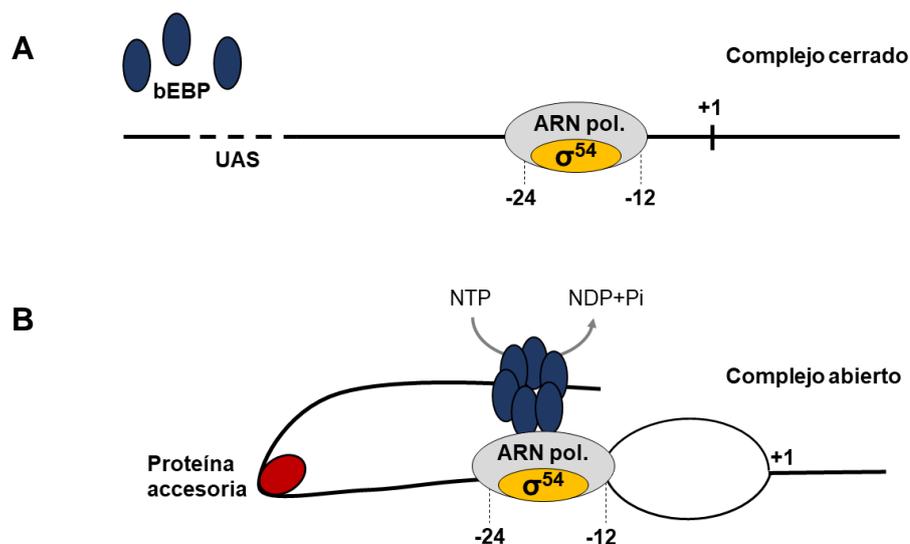


Figura 06. Mecanismo de activación de promotores dependientes de σ^{54} . (A) La transcripción de los promotores dependientes de σ^{54} requiere de activadores o bEBP (en azul) que se unen a regiones aguas arriba del promotor conocidas como UAS para interaccionar con la ARN polimerasa previamente unida al ADN. El factor σ^{54} reconoce sitios conservados en las posiciones -12 y -24 y recluta al resto de subunidades de la ARN polimerasa para formar una estructura incapaz de iniciar la transcripción denominada complejo cerrado. (B) El activador se une al ADN y, gracias a la acción de proteínas accesorias que pliegan el ADN (en rojo), interacciona con la ARN polimerasa. Tras la interacción, el activador hidroliza nucleótidos trifosfato (habitualmente ATP) generando la energía suficiente para separar las hebras de ADN. La separación de las hebras forma una estructura conocida como complejo abierto y permite que la ARN polimerasa inicie la transcripción. Figuras adaptadas de (Buck *et al.*, 2000; Cases *et al.*, 2003).

3.3.3 Regulación dependiente de σ^{28} (FliA)

En muchos de los sistemas descritos hasta la fecha, la expresión de los genes flagelares más tardíos depende del factor σ alternativo denominado σ^{28} o FliA (Smith & Hoover, 2009). Dado su papel en la síntesis de flagelo también se le conoce como factor σ flagelar. A diferencia de los promotores dependientes de σ^{54} , los promotores dependientes de FliA no requieren de la intervención de un activador para iniciar la transcripción y reconocen secuencias consenso muy similares a las reconocidas por σ^{70} , igualmente localizadas en las posiciones -10 y -35, respecto al inicio de la transcripción (Kutsukake *et al.*, 1990).

Los primeros estudios acerca de FliA, realizados en *Salmonella typhimurium*, determinaron que el factor anti- σ^{28} conocido como FlgM es el responsable de inhibir la actividad de FliA, así como de disociar los complejos FliA-polimerasa ya formados (Ohnishi *et al.*, 1992; Chadsey & Hughes, 2001). La presencia de FlgM ha sido posteriormente descrita en muchos otros microorganismos flagelados como *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. o *E. coli* (Smith & Hoover, 2009).

De forma más reciente, se ha descrito que el papel de FliA no se limita a la transcripción de genes flagelares, sino que es necesario para la expresión de genes relacionados con otros procesos como el metabolismo del di-GMPc en *P. putida* o la patogénesis en *P. aeruginosa* (Díaz-Salazar *et al.*, 2017; Lo *et al.*, 2018).

3.4 Control espacial y numérico del ensamblaje flagelar

Además del propio ensamblaje, los organismos regulan de forma precisa otros aspectos de la síntesis flagelar como la localización de los flagelos y su número. Ninguna de estas características se ve alterada con el paso de las generaciones y en muchos casos suponen una señal de identidad de la especie en cuestión. Los mecanismos que permiten controlar estos factores son tan diversos como diversos son los tipos de flagelación en bacterias.

En bacterias peritricas como *E. coli* o *S. typhimurium* no se han descrito proteínas que actúen como puntos de referencia para el ensamblaje del flagelo en una determinada localización. La propia distribución de los flagelos a lo largo del eje celular asegura que ambas células hijas reciben suficientes como para desarrollar una capacidad de natación eficiente inmediatamente tras la división (Mears *et al.*, 2014). A diferencia de estas, en gran parte de las bacterias con flagelación polar estudiadas, el proceso se encuentra

Introducción

mediado por las proteínas FlhF y FleN (también anotada como FlhG) que se encargan del control espacial y numérico del flagelo, respectivamente. El par FlhF-FleN también se encuentra presente en algunas bacterias peritricas como *B. subtilis* (Guttenplan *et al.*, 2013), aunque por el momento no se conoce con claridad el papel que juegan en el establecimiento de este tipo de flagelación.

FlhF. FlhF presenta en su estructura dominios de unión a GTP conservados y su actividad GTPasa ha sido demostrada *in vitro* en diferentes especies (Schniederberend *et al.*, 2013). En *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, la unión de GTP propicia la formación de homodímeros de FlhF, que se disocian tras la hidrólisis del nucleótido (Bange *et al.*, 2007; Schniederberend *et al.*, 2013).

FlhF se encuentra habitualmente asociada a la membrana del polo flagelado (Kusumoto *et al.*, 2008; Murray & Kazmierczak, 2006). En *V. cholerae*, una vez en el polo, FlhF es la encargada de reclutar a los elementos iniciales del ensamblaje flagelar (FliF) gracias al dominio B situado en el extremo N-terminal de la proteína (Green *et al.*, 2009). Sin embargo, este dominio muestra variaciones muy significativas tanto en tamaño como en grado de conservación entre especies por lo que no resulta sencillo extrapolar los resultados (Kusumoto *et al.*, 2008; Salvetti *et al.*, 2007).

En bacterias monotricas como *P. aeruginosa* o *V. cholerae*, la delección de FlhF tiene como consecuencia la pérdida o deslocalización del flagelo, lo que deriva en importantes problemas de movilidad. Por el contrario, su superproducción genera células hiperflageladas (Fig. 07), también acompañadas de graves defectos en movilidad (Correa *et al.*, 2005; Pandza *et al.*, 2000). El papel que juega la actividad GTPasa de FlhF en la regulación de este proceso sigue siendo controvertido. En la bacteria monotrica *Campylobacter jejuni*, la mutación de los dominios con actividad GTPasa altera el número y la posición de los flagelos generados. Sin embargo, en *V. cholerae* o *P. aeruginosa*, una mutación equivalente afecta principalmente al funcionamiento flagelar y no al control numérico o espacial (Balaban *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2009; Schniederberend *et al.*, 2013).

Otra de las cuestiones que aún se discuten es la influencia de FlhF sobre la transcripción de los genes flagelares. En *P. aeruginosa*, la mutación de *flhF* disminuye discretamente los niveles de transcripción de la flagelina mediante un mecanismo por el momento desconocido (Murray & Kazmierczak, 2006). En el caso de *Vibrio*, la ausencia de FlhF disminuye la expresión de todos los genes de clase III (Correa *et al.*, 2005).

FleN. FleN es una proteína muy conservada en los diferentes grupos bacterianos que presenta un alto grado de homología estructural con la proteína MinD, implicada en la formación del anillo Z en el ecuador celular durante la citocinesis (Lutkenhaus, 2007). Ambas proteínas comparten la actividad ATPasa y el dominio MTS (*Membrane-targeting sequence*), que les permite interactuar con los fosfolípidos de la membrana (Szeto *et al.*, 2002). La interacción de FleN con la membrana tiene lugar cuando se encuentra unida a una molécula de ATP y formando un homodímero. La hidrólisis del ATP fomenta la disociación del dímero y la posterior separación de la membrana (Schuhmacher *et al.*, 2015). Por lo que, de forma similar a lo que ocurre con FlhF, FleN puede encontrarse como monómero libre en el citoplasma o formando dímeros unidos a membrana. En relación a su papel en la regulación de la síntesis y ensamblaje flagelar a FleN se le atribuyen dos funciones principales. Por un lado, FleN se encarga, junto con el di-GMPc, de modular la actividad del regulador principal FleQ en *Pseudomonas* spp. (Dasgupta *et al.*, 2000), mientras que por otra parte, interviene en el control numérico del sistema flagelar en especies con diferentes tipos de flagelación (Dasgupta *et al.*, 2000; Kusumoto *et al.*, 2006; van Amsterdam & van der Ende, 2004).

En *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, la delección de *fleN* transforma la flagelación monotrica habitual en flagelación lofotrica, con entre 8 y 10 flagelos en el polo (Dasgupta *et al.*, 2000), mientras que su sobreexpresión genera células aflageladas (Correa *et al.*, 2005) (Fig. 07). En esta última especie, la ausencia o sobreexpresión de FleN modifica los patrones de expresión génica indirectamente, mediante la modulación de la actividad del regulador FleQ (Matsuyama *et al.*, 2016; Chanchal *et al.*, 2017). Por lo que aún queda por determinar si el fenotipo observado en estos mutantes se debe exclusivamente a la alteración en la síntesis de proteínas flagelares o a la acción directa de FleN sobre el ensamblaje. En microorganismos que carecen de activadores transcripcionales similares a FleQ, como *C. jejuni*, la delección de *fleN* también provoca un aumento en el número de flagelos ensamblados (Balaban & Hendrixson, 2011; Gulbranson *et al.*, 2016). Estos datos apoyan la hipótesis de que FleN juega un papel en el control numérico del flagelo por sí mismo y no de manera indirecta a través de la expresión de los genes flagelares.

Los distintos fenotipos asociados a la delección y superproducción de FlhF y FleN en *P. aeruginosa* se resumen en la figura 07.

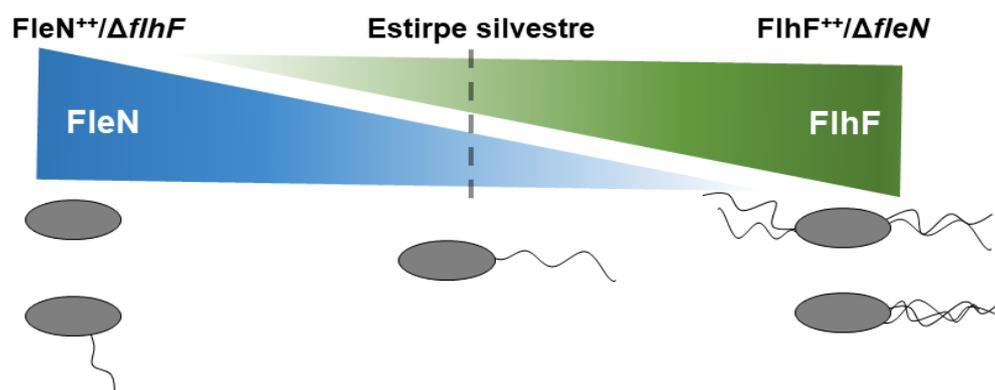


Figura 07. Fenotipos asociados a la modificación de los niveles de FlhF y FleN en *P. aeruginosa*. La superproducción de FleN o la deleción de FlhF genera fenotipos aflagelados o con flagelo deslocalizado. La superproducción de FlhF o la deleción de FleN generan hiperflagelación y en algunos casos flagelación anfitrica (Dasgupta *et al.*, 2000).

Interacción FlhF-FleN. La interacción entre ambas proteínas ha sido descrita en organismos con diferente disposición flagelar como *B. subtilis*, con flagelación peritrica, o *V. alginolyticus* y *C. jejuni*, con flagelación monotrica. En todos los casos, el resultado de la interacción fue un incremento de la actividad GTPasa de FlhF, llegando a un aumento de hasta el 450 % en el caso de *C. jejuni* (Bange *et al.*, 2011; Gulbranson *et al.*, 2016; Kusumoto *et al.*, 2008). Sin embargo, el efecto que tiene este aumento en la actividad GTPasa sobre el patrón de flagelación en cada uno de estos organismos es desconocido.

En *V. alginolyticus*, FleN inhibe parcialmente la localización polar de FlhF, de tal manera que los mutantes incapaces de producir FleN acumulan FlhF con mayor intensidad en el polo que la estirpe silvestre (Kusumoto *et al.*, 2008). Según los autores, la sobreacumulación de FlhF explicaría los fenómenos de hiperflagelación descritos en muchos mutantes *fleN*⁻.

4. *Pseudomonas putida* como modelo para el estudio del cambio en el estilo de vida

Pseudomonas putida es una bacteria Gram-negativa no patógena que se encuentra asociada mayoritariamente a la rizosfera, aunque posee capacidad para colonizar nichos ambientales diversos gracias a su extraordinaria versatilidad metabólica y a sus escasos requisitos nutricionales. Se trata de un microorganismo genéticamente accesible y que se caracteriza por presentar unas condiciones sencillas de cultivo, tanto en laboratorio como a gran escala. Esto ha posibilitado que durante las últimas décadas

se hayan desarrollado innumerables herramientas para la modificación genética y la expresión heteróloga de genes de interés (Martínez-García *et al.*, 2014; Nikel *et al.*, 2014; Wigneswaran *et al.*, 2016). Los genomas de las estirpes más representativas de *P. putida* se encuentran completamente secuenciados y han servido de base para numerosos estudios transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos, incluyendo una reciente reconstrucción metabólica (Nogales *et al.*, 2017). Presenta además una alta tolerancia a compuestos xenobióticos, entre los que se encuentran antibióticos y solventes orgánicos (Loeschcke & Thies, 2015). Esta tolerancia, junto a la alta versatilidad metabólica, hacen que *P. putida* sea ampliamente utilizada en la biodegradación de compuestos recalcitrantes, en procesos de biorremediación o como factoría microbiana para la producción industrial de compuestos tan diversos como terpenos o policétidos (Santos *et al.*, 2004; Loeschcke & Thies, 2015; Pobleto-Castro *et al.*, 2012).

4.1 El biofilm en *P. putida*

P. putida es capaz de formar biofilms sobre numerosos materiales y superficies, lo que le facilita la colonización de micronichos en las raíces y en las partículas de suelo de la rizosfera (Rinaudi & Giordano, 2010). Esta habilidad también otorga a *P. putida* el potencial de actuar como hospedador en procesos de producción biotecnológica basados en biofilms (Boltz *et al.*, 2017). En este sentido, el biofilm formado por *P. putida* presenta diversas ventajas con respecto al desarrollado por otros microorganismos: 1) se puede formar en superficies de diferente naturaleza, tanto bióticas como abióticas; 2) presenta una alta tolerancia a solventes y tóxicos; y 3) su estabilidad deriva principalmente de la composición proteica de la matriz extracitoplasmática. Esta última cualidad permite emplear mutantes defectivos en la síntesis de exopolisacáridos que mantienen su capacidad para formar biofilm, lo que resulta idóneo para su uso en reactores (Baumgarten *et al.*, 2012; Karatan & Watnick, 2009; Nilsson *et al.*, 2011).

4.1.1 Ciclo de desarrollo del biofilm en *P. putida* KT2440

P. putida sigue las 4 etapas canónicas del desarrollo del biofilm descritas en la sección 1.1 y representadas esquemáticamente en la figura 01.

A. Adhesión. *P. putida* reconoce una amplia gama de superficies de diferente naturaleza a las que puede unirse para iniciar la formación de biofilm. La movilidad generada por el sistema flagelar le permite alcanzar y adherirse al sustrato tras apenas unos segundos de exposición (Klausen *et al.*, 2006). El penacho de flagelos también juega

Introducción

un papel importante, aunque no esencial, en el reconocimiento y unión inicial a la superficie. Es frecuente observar células que inician el proceso de adhesión gracias a la interacción del polo flagelado con el sustrato, rotando sobre sí mismas impulsadas por el movimiento flagelar. Sin embargo, la presencia de flagelo no supone una condición indispensable para la adhesión y posterior formación del biofilm en este microorganismo, tal y como demuestran los experimentos realizados con un mutante aflagelado *fliM*⁻, capaz de formar un biofilm robusto en cámara de flujo (Gjermansen *et al.*, 2005) o los realizados en nuestro propio grupo con un mutante *fliA*⁻ (Navarrete *et al.*, 2019), por lo que la función específica del flagelo en esta etapa en *P. putida* aún resulta controvertida.

Poco después de la unión inicial, las células transitan hacia una adhesión irreversible. La interacción apical da paso a una interacción lateral con mayor superficie de contacto con el sustrato. Este proceso está mediado por la adhesina de superficie LapA (Fig. 08), una proteína altamente conservada en diferentes especies de *Pseudomonas* ambientales y cuya función se ha estudiado principalmente en *P. fluorescens* (Gjermansen *et al.*, 2005). Como miembro de la familia de proteínas BAP (*Biofilm-Associated Proteins*), la adhesina LapA se caracteriza por su elevado peso molecular, siendo el péptido de mayor tamaño codificado en el genoma de *P. putida* KT2440, y por la presencia en su estructura de motivos característicos que se disponen repetidos en tándem (Latasa *et al.*, 2006). Dado el tamaño de esta proteína, es necesaria la actuación de un transportador tipo ABC específico, codificado por el operon *lapBCE*, para su exportación a la membrana.

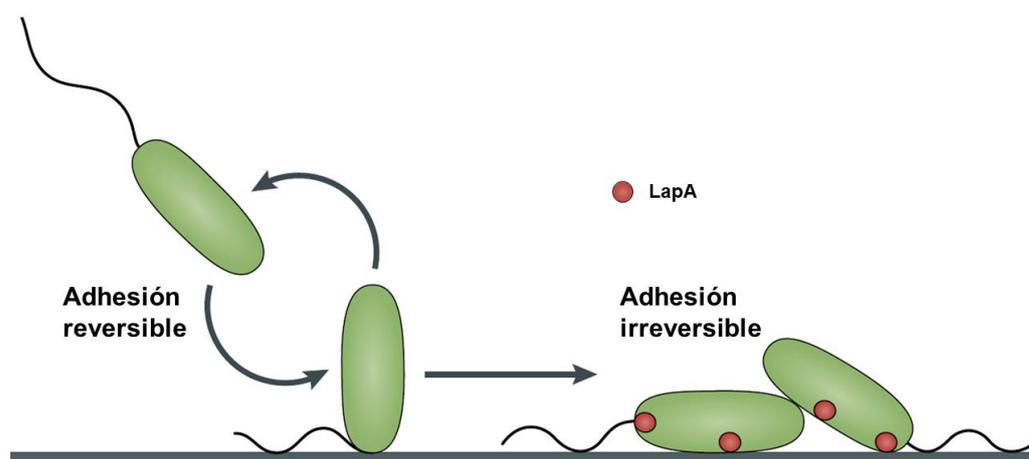


Figura 08. Representación esquemática de la adhesión en *P. putida*. Las bacterias flageladas se desplazan activamente hasta las superficies. En la mayoría de ocasiones, la interacción inicial está mediada por el flagelo y se produce de forma apical. La transición hacia una adhesión irreversible implica un reposicionamiento de las células hacia una posición de interacción longitudinal con la superficie, donde la adhesina LapA resulta fundamental. Esquema adaptado de (Berne *et al.*, 2018).

B. Proliferación. Al comienzo de la etapa de proliferación en *P. putida*, las células adheridas de manera irreversible pierden la movilidad flagelar y comienzan a dividirse para generar microcolonias de células aflageladas. De forma simultánea, comienza la síntesis de los elementos que constituirán la matriz del biofilm (Sauer & Camper, 2001). *P. putida* sintetiza 4 exopolisacáridos: celulosa, alginato, Pea (*putida exopolysaccharide A*) y Peb (*putida exopolysaccharide B*). Aunque es capaz de formar biofilm en ausencia de ellos, estos colaboran activamente en la estabilidad del mismo y le aportan resistencia frente a condiciones de estrés ambiental (Nilsson *et al.*, 2011). El complejo de la celulosa sintasa, codificado en el operon *bcs*, se encarga de sintetizar la celulosa. La función principal de este compuesto es fomentar la agregación de las células así como aportar rigidez y resistencia al biofilm (Ude *et al.*, 2006). En la especie cercana *P. fluorescens*, también se ha descrito como un elemento trascendental durante la colonización de ciertas superficies vegetales (Gal *et al.*, 2003). La síntesis de alginato tiene lugar mayoritariamente en condiciones de estrés hídrico, ya que su presencia fomenta un cambio en la estructura del biofilm que da lugar a microambientes con mayor disponibilidad hídrica. Como consecuencia, mutantes *algD*⁻, defectivos en la síntesis de alginato, desarrollan un biofilm más sensible a la limitación de agua (Chang *et al.*, 2007). En el caso de Pea, también se ha constatado que contribuye ligeramente a reducir los efectos adversos del estrés hídrico, aunque su papel se centra en mantener las interacciones célula-célula que se dan en el seno del biofilm. Mutantes *peaGHI*⁻ desarrollan biofilms indistinguibles de los generados por la estirpe silvestre durante sus primeros estadios, aunque son incapaces de generar biofilms maduros tan robustos como los de la estirpe silvestre, dada la trascendencia de las interacciones intercelulares en las etapas más tardías (Nielsen *et al.*, 2011). La información acerca del polisacárido Peb es mucho más limitada y hasta la fecha únicamente se le atribuye la capacidad para aumentar la resistencia del biofilm frente al tratamiento con detergentes (Nilsson *et al.*, 2011).

Entre las proteínas con un papel relevante en esta etapa encontramos la adhesina LapF. LapF comparte similitudes evidentes con LapA, aunque no presentan un alto grado de homología en sus secuencias. Ambas proteínas tienen un gran tamaño, se disponen en la pared celular y presentan repeticiones en tándem características (Fuqua, 2010). A pesar de estas similitudes, LapF tiene como misión principal cohesionar el biofilm en desarrollo mediante la formación de interacciones célula-célula (Martínez-Gil *et al.*, 2010), mientras que LapA actúa principalmente, aunque no de forma exclusiva, durante las primeras etapas de interacción con la superficie (Gjermansen *et al.*, 2010).

Introducción

Durante esta etapa también comienza la liberación de ADN extracelular con función estructural a la matriz en formación. En *P. putida*, los niveles de ADN extracelular pueden ser muy altos en etapas avanzadas del biofilm llegando al 36 % del ADN total presente en el biofilm, en comparación con el 20 % que se alcanza en *P. aeruginosa* (Steinberger & Holden, 2005).

C. Maduración. A medida que la microcolonia aumenta su volumen, se generan gradientes que dan lugar a condiciones muy heterogéneas en su interior. En muchos de estos micronichos, los niveles bajos de oxígeno y/o la escasez de nutrientes llevan a algunas bacterias a recuperar su movilidad y abandonar el interior de la microcolonia de forma activa (Klausen *et al.*, 2006). Sauer y colaboradores demostraron que los genes relacionados con la síntesis de flagelo que se reprimen fuertemente tras la adhesión inicial, son de nuevo expresados en ciertas subpoblaciones dentro del biofilm en etapas más tardías (Sauer & Camper, 2001). Es precisamente esta migración dependiente de flagelo la que hace posible la transformación de las microcolonias compactas, características de la etapa de proliferación, en las estructuras más difusas y complejas propias del biofilm maduro (Klausen *et al.*, 2006). El estudio del biofilm en mutantes aflagelados a menudo revela la existencia de agregados más compactos que los observados en la estirpe silvestre móvil, lo que sugiere que el flagelo juega un papel relevante en el posicionamiento de las bacterias dentro de las propias estructuras del biofilm (Cárcamo-Oyarce *et al.*, 2015). Durante la reestructuración, el biofilm deja de ser una estructura monoclonal y es frecuente encontrar una mezcla de microorganismos procedentes de diferentes microcolonias. Las sucesivas divisiones celulares en el interior del biofilm generan una estructura de mayor volumen donde la mayoría de las interacciones pasan a ser entre células y no directamente con el sustrato.

D. Dispersión. En *P. putida*, los procesos que desencadenan la dispersión activa del biofilm pueden ocurrir de forma rápida y generalizada en cualquiera de las etapas como respuesta a la limitación de carbono u oxígeno en el medio (Gjermansen *et al.*, 2005). Los mutantes no móviles dispersan el biofilm de forma similar a como lo hace la estirpe silvestre, indicando que el proceso no se basa únicamente en la recuperación de la movilidad de las células que constituyen la comunidad (Gjermansen *et al.*, 2005).

La respuesta estricta se asocia habitualmente a procesos de formación de biofilm en especies como *Streptococcus mutans*, *E. coli* o *L. monocytogenes* (Lemos *et al.*, 2004; Aberg *et al.*, 2006; Renier *et al.*, 2011). Sin embargo, este fenómeno constituye uno de los sistemas que regulan el proceso de dispersión en *P. putida*. La conexión entre la

respuesta estricta y la dispersión del biofilm en este microorganismo ha sido extensamente descrita por nuestro grupo (Díaz-Salazar *et al.*, 2017). En respuesta a una situación de estrés nutricional, comienzan a sintetizarse nucleótidos de guanosina (p)ppGpp en la célula gracias a la actividad de las proteínas RelA y SpoT (Gaca *et al.*, 2015). Este aumento, junto con el factor sigma FliA, estimulan la expresión de *bifA*, que codifica la fosfodiesterasa (PDE) de di-GMPc BifA (Rodríguez-Herva *et al.*, 2010). Esta PDE previene la producción excesiva de biofilm durante la etapa de crecimiento y promueve la dispersión del biofilm al disminuir los valores intracelulares de di-GMP (Jiménez-Fernández *et al.*, 2015).

Los mecanismos moleculares que hacen posible la dispersión del biofilm en respuesta a una disminución de los niveles de di-GMPc intracelular también son conocidos y han sido estudiados en detalle en la especie cercana *P. fluorescens*. En esta bacteria se demostró que la dispersión del biofilm depende de la proteólisis del extremo N-terminal de la adhesina LapA por la proteasa LapG, cuya actividad se encuentra regulada por LapD en respuesta a los niveles intracelulares de di-GMPc. (Newell *et al.*, 2011). En ausencia de di-GMPc, LapD presenta una conformación inactiva y es incapaz de unirse a LapG, que permanece de esta forma activa y proteoliza a LapA. A medida que los niveles de di-GMPc aumentan en la célula, este se une al dominio citoplasmático de LapD. Superado un determinado umbral, se produce un cambio conformacional en LapD que le permite secuestrar a LapG y evitar la degradación de LapA (Navarro *et al.*, 2011). Al igual que ocurre en *P. fluorescens*, en *P. putida*, los mutantes *lapG*⁻ no ven alterada la expresión de *lapA*, aunque muestran un fenotipo de hiperformación de biofilm y son incapaces de dispersarlo (Gjermansen *et al.*, 2010; Newell *et al.*, 2011), indicando que LapG interviene en la degradación de LapA, y no en su síntesis. Por su parte, un mutante *lapD* es incapaz de formar biofilm en *P. putida* (Gjermansen *et al.*, 2010) sugiriendo un papel similar al previamente descrito para esta proteína en *P. fluorescens*. La conservación de todos los elementos en *P. putida*, así como los fenotipos observados en los diferentes mutantes indican que el sistema podría funcionar de forma semejante en ambos microorganismos.

4.2 El sistema flagelar en *P. putida*

Durante la etapa planctónica, *P. putida* presenta flagelación lofotrica unipolar, con un número de flagelos que varía entre 5 y 7 (Harwood *et al.*, 1989). Los flagelos de *P. putida* promueven la movilidad individual en suspensión (*swimming*) para la que se han descrito 3 patrones de movimiento: "hacia delante" con los flagelos dispuestos en el polo

Introducción

opuesto (*pushing*), movilidad "marcha atrás", con los flagelos dispuestos por delante de la célula (*pulling*), y una forma de movilidad lenta en la cual los flagelos envuelven a la célula (*coiling*) (Hintsche *et al.*, 2017). De igual forma, la presencia de flagelos hace posible la movilidad colectiva sobre superficies conocida como *swarming* (Harwood *et al.*, 1989; Matilla *et al.*, 2007). En ambos casos, la función flagelar se encuentra regulada por procesos de quimiotaxis. En este microorganismo, se ha descrito una amplia variedad de efectores atrayentes y repelentes, así como sus proteínas sensoras (MCPs) que reflejan la gran versatilidad metabólica de la especie (Sampedro *et al.*, 2015).

El sistema flagelar, así como su regulación, se encuentran poco estudiados en *P. putida* KT2442 a pesar de representar, junto a *Helicobacter pylori* (Jones *et al.*, 1985), uno de los pocos modelos de flagelación lofotrica unipolar. *P. putida* KT2442 agrupa los genes relacionados con la síntesis de flagelo, así como del sistema de quimiotaxis, en una región conocida como clúster flagelar. La incapacidad para formar flagelo del mutante $\Delta fleQ$ (Wang *et al.*, 2018) sugiere que este regulador se encarga de activar la expresión de los genes incluidos en esta región, tal y como ocurre en otras especies de *Pseudomonas* (Dasgupta *et al.*, 2002). Sin embargo, a diferencia de lo observado en otras estirpes aflageladas, el mutante $\Delta fleQ$ también es defectivo en la formación de biofilm, lo que pone de manifiesto la posición central de FleQ en ambos procesos (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018). Estudios bioinformáticos sugieren que el factor σ^{54} (RpoN) es igualmente necesario para la expresión de la mayoría de los operones del clúster flagelar (Cases *et al.*, 2003). Estos datos son coherentes con el hecho de que un mutante $\Delta rpoN$ sea incapaz de sintetizar flagelo (Köhler *et al.*, 1989). Sin embargo, no se han realizado experimentos que permitan confirmar el papel del factor σ^{54} sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de flagelo. Otro de los elementos presentes en *P. putida* y que se encuentra habitualmente involucrado en la expresión de los genes que codifican los elementos ensamblados en las últimas etapas de la síntesis flagelar es el factor σ flagelar FliA. Su participación en la cascada de *P. putida* se encuentra respaldada por estudios transcriptómicos llevados a cabo con un mutante *fliA*⁻, en los que se identificaron posibles secuencias diana para este factor σ en promotores flagelares (Rodríguez-Herva *et al.*, 2010)

La información acerca de la regulación de la posición y el número de flagelos es igualmente limitada en *P. putida*. Pandza y colaboradores describieron que la disrupción del gen *flhF* genera una disposición aleatoria de los flagelos mientras que estirpes que lo superproducen mantienen la posición polar pero aumentan en número (Pandza *et al.*, 2000), sugiriendo que FlhF participa en el proceso de localización flagelar.

4.3 Regulación del cambio del estilo de vida en *P. putida*

Los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc coordinan la transición entre los diferentes estilos de vida en *P. putida* KT2442. Aunque no existen muchos estudios al respecto, este rol puede inferirse principalmente de los fenotipos asociados a la sobreexpresión o inactivación de enzimas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) o fosfodiesterasa (PDE), como BifA o GcbA (Gjermansen *et al.*, 2005; Matilla *et al.*, 2011; Jiménez-Fernández *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2016). Además, la incapacidad tanto para sintetizar flagelos como para formar biofilm que presenta el mutante $\Delta fleQ$ sugiere que ambos elementos interaccionan para regular la transición entre estilos de vida, tal y como ha sido descrito en otros microorganismos como *P. aeruginosa* o *V. cholerae* (Hickman & Harwood, 2008; Srivastava *et al.*, 2013). Recientemente se ha comprobado que FleQ también participa de forma directa en la expresión de hasta 5 genes que codifican enzimas supuestamente implicadas en el metabolismo del di-GMPc (PDE/DGC) (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016), lo que sugiere la existencia de una relación compleja que podría regular de forma precisa los niveles de di-GMPc y la propia actividad de FleQ. No obstante, el genoma de *P. putida* KT2442 codifica hasta 43 proteínas potencialmente implicadas en la regulación de los niveles de di-GMPc y únicamente una minoría ha sido caracterizada en detalle (Jiménez-Fernández *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2016).

Objetivos

1. Caracterizar la regulación del gen *lapA* y el operón *bcs*, relacionados con la formación de biofilm en *P. putida* KT2442.
2. Establecer un modelo para la cascada de activación transcripcional que permite la síntesis flagelar en *P. putida* KT2442
3. Determinar los sistemas de control posicional y numérico de los flagelos en *P. putida* KT2442.

Materiales y métodos

1. Estirpes, plásmidos y oligonucleótidos

A continuación se detallan las estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 01. Estirpes bacterianas utilizadas durante la realización de este trabajo.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	f80 Δ <i>lacZ</i> ΔM15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk+) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i> .	(Hanahan, 1983)
DH5α λ-pir	f80 Δ <i>lacZ</i> ΔM15(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-mk+) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i> fago lisogénico λ-pir.	(Platt <i>et al.</i> , 2000)
MACH1-T1r	f80(<i>lacZ</i>) ΔM15 Δ <i>lacX74 hsdR</i> (rk, mk+) Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> .	Invitrogen
NCM631	HsdS <i>gal lacZDM15:lacI lacUV5:gen1</i> (RNA polimerasa de T7) D <i>lac-Tn10</i> .	(Govantes & Santero, 1996)
One Shot <i>ccd'</i> 2T1	<i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) f80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araΔ139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm ^r) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i> .	Invitrogen
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Estirpe silvestre. Cm ^r .	(Bagdasarian <i>et al.</i> 1981)
KT2440-IHF3	mt-2 <i>hsdR1</i> (r m ⁺) Δ <i>ihfA::Km</i> . Cm ^r Km ^r .	(Marqués <i>et al.</i> 1998)
KT2442	mt-2 <i>hsdR1</i> (r m ⁺). Cm ^r Rif ^r .	(Franklin <i>et al.</i> 1981)
KT2442::TpMRB197	KT2442 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
KT2442::TpMRB198	KT2442 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliN-gfpmut3</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
KT2442::TpMRB236	KT2442 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fimV-gfpmut3</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
KT2442::TpMRB239	KT2442 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal dTOMATO-PP-4334</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB34	KT2442 miniTn5-Km:: <i>lapA</i> . Cm ^r Rif ^r Km ^r .	(Platero A, sin publicar)
MRB34::TpMRB164	MRB34 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal yjhI</i>]:: <i>glmS</i> . Km ^r Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB34::TpMRB165	MRB34 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal pleD</i>]:: <i>glmS</i> . Km ^r Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB52	KT2442 Δ <i>fleQ</i> . Cm ^r Rif ^r .	(Jiménez-Díaz, sin publicar)
MRB52::TpMRB197	MRB52 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i>]:: <i>glmS</i> Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo

Materiales y métodos

MRB52::TpMRB178	MRB52 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fleQ-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB69	KT2442 $\Delta flhF$. Cm ^r Rif ^r .	(Serrano L, sin publicar)
MRB69::TpMRB197	MRB69 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB69::TpMRB198	MRB69 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliN-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB69::TpMRB236	MRB69 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fimV-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB69::TpMRB239	MRB69 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal dTOMATO-PP-4334</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB71	KT2442 $\Delta fleN$. Cm ^r Rif ^r .	(Serrano L, sin publicar)
MRB71::TpMRB197	MRB71 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB71::TpMRB198	MRB71 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliN-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB71::TpMRB236	MRB71 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fimV-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB71::TpMRB239	MRB71 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal dTOMATO-PP-4334</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB78	KT2442 $\Delta flhF \Delta fleN$. Cm ^r Rif ^r .	(Serrano L, sin publicar)
MRB93	KT2442 $\Delta fleR$. Cm ^r Rif ^r .	Este trabajo
MRB97	KT2442 $\Delta fimV$. Cm ^r Rif ^r .	Este trabajo
MRB97::TpMRB197	MRB97 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB97::TpMRB198	MRB97 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliN-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB97::TpMRB236	MRB97 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fimV-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB97::TpMRB239	MRB97 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal dTOMATO-PP-4334</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB113	KT2442 $\Delta pp4334$. ($\Delta parC$) Cm ^r Rif ^r .	Este trabajo
MRB113::TpMRB197	MRB113 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal flhF-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB113::TpMRB198	MRB113 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliN-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB113::TpMRB236	MRB113 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fimV-gfpmut3</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB113::TpMRB239	MRB113 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal dTOMATO-PP-4334</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB130	KT2442 $\Delta flagellarcluster$. Cm ^r Rif ^r .	Este trabajo
MRB130::TpMRB172	MRB130 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal</i> :: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo

MRB130::TpMRB178	MRB130 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fleQ</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB130::TpMRB286	MRB130 miniTn7BB-Gm [<i>nahR-Psal fliA</i>]:: <i>glmS</i> . Cm ^r Rif ^r Gm ^r .	Este trabajo
MRB149	KT2442 Δ <i>rpoN</i> . Cm ^r Rif ^r .	Este trabajo

Tabla 02. Plásmidos usados durante la realización de este trabajo. Las posiciones que se detallan en algunas de las descripciones de los plásmidos hacen referencia a las coordenadas en el genoma de *P. putida* KT2442 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC-002947.4>).

Plásmido	Descripción	Referencia
pBBR1 MCS-4	Vector de amplio espectro. Mob ⁺ Ap ^r /Cb ^r	(Kovach <i>et al.</i> 1995)
pEMG	Vector de integración para la generación de deleciones con el sistema de I-SceI. Origen de replicación R6K. Km ^r .	(Martínez-García & de Lorenzo, 2011)
pEMG-flagella	Vector pEMG donde se clonaron 1,56 Kb correspondientes a las regiones flanqueantes del clúster flagelar de <i>P. putida</i> KT2440.	(Martínez-García <i>et al.</i> 2013)
pENTR/D-TOPO	Vector linearizado ligado a topoisomerasa usado en el sistema de clonación direccional Gateway. Km ^r .	Invitrogen
pEX18Tc	Vector para reemplazamiento génico. Tc ^r SacB ⁺ oriT ⁺ .	(Hoang <i>et al.</i> 1998)
pFLP2	Plásmido de expresión de la recombinasa FLP. Ap ^r /Cb ^r .	(Hoang <i>et al.</i> 1998)
PIZ227	Plásmido derivado de pLysE (Kleiner <i>et al.</i> , 1988; Studier & Moffatt, 1986) que lleva el represor laqI ^q de pMM40 (Kleiner <i>et al.</i> , 1988). Cm ^r .	(Govantes & Santero, 1996)
pMPO234	Vector de amplio espectro para fusiones transcripcionales <i>trp-lacZ</i> , basado en pBBR1MCS-4. Mob ⁺ Ap ^r .	(García-González <i>et al.</i> 2005)
pMRB1	Vector de amplio espectro derivado de pMPO234 para fusiones transcripcionales <i>lacZ-gfpmut3</i> . Ap ^r /Cb ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2014)
pMRB2	Vector derivado de pMRB1 que contiene el cassette de conversión al sistema GATEWAY <i>attR1</i> -Cm ^r - <i>ccdB</i> - <i>attR2</i> clonado con SmaI dejando el extremo <i>attR1</i> más cercano a <i>gfpmut3</i> . Ap ^r /Cb ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2014)
pMRB3	Vector derivado de pMRB1 que contiene el cassette de conversión al sistema GATEWAY <i>attR1</i> -Cm ^r - <i>ccdB</i> - <i>attR2</i> clonado con SmaI dejando el extremo <i>attR2</i> más cercano a <i>gfpmut3</i> . Ap ^r /Cb ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2014)

Materiales y métodos

pMRB67	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>lapA</i> (pos. 4917232 a 4918232) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB2. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> , 2016)
pMRB89	Vector derivado de pKT230 que contiene la región codificante de <i>yjhH</i> procedente de <i>E. coli</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Sm ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> , 2014)
pMRB95	Vector pTYB12 que contiene la región codificante de <i>fleQ</i> junto con el dominio de unión a quitina en su extremo N-terminal para su sobreexpresión y purificación mediante el sistema IMPACT. Ap ^r .	(Navarrete <i>et al.</i> , 2019)
pMRB112	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>bcs</i> (pos. 4917232 a 4917785) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB2. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> , 2016)
pMRB132	Vector pTYB12 que contiene la región codificante de <i>fleN</i> junto con el dominio de unión a quitina en su extremo N-terminal para su sobreexpresión y purificación mediante el sistema IMPACT. Ap ^r .	(Navarrete <i>et al.</i> , 2019)
pMRB164	Vector derivado de pMRB172 que contiene la región codificante de <i>yjhH</i> procedente de <i>E. coli</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	(Claret L & Escobar A, sin publicar)
pMRB165	Vector derivado de pMRB172 que contiene la región codificante de <i>pleD</i> procedente de <i>Caulobacter crescentus</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	(Claret L & Escobar A, sin publicar)
pMRB172	Vector derivado de pUC18SfiminiTn7BB-Gm donde se clonó el sistema de expresión inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	(Claret L & Escobar A, sin publicar)
pMRB178	Vector derivado de pMRB172 que contiene la región codificante de <i>fleQ</i> bajo el sistema de expresión inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB187	Vector derivado de pUC18SfiminiTn7BB-Gm donde se clonó la región codificante del gen <i>gfpmut3</i> para el marcaje con GFP de proteínas en su extremo C-terminal. Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB189	Vector de expresión de proteínas de fusión derivado de pMRB172 donde se clonó la región codificante de <i>gfpmut3</i> para el marcaje con GFP de proteínas en su extremo C-terminal. Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB192	Vector derivado de pEX18Tc en el que se clonaron 700 pb aguas arriba y aguas abajo de la región codificante del gen <i>fleR</i> . Estas regiones flanquean un cassette de resistencia a kanamicina. Es un vector para la construcción del mutante $\Delta fleR$. Tc ^r Km ^r .	Este trabajo

pMRB197	Vector de expresión derivado de pMRB189 donde se clonó la región codificante del gen <i>flhF</i> junto con la región SD descrita en (Elowitz & Leibler, 2000). Permite la expresión de la proteína de fusión FlhF- <i>gfpmut3</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR</i> -P <i>Sal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB198	Vector de expresión derivado de pMRB189 donde se clonó la región codificante del gen <i>fliN</i> junto con la región SD descrita en (Elowitz & Leibler, 2000). Permite la expresión de la proteína de fusión FliN- <i>gfpmut3</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR</i> -P <i>Sal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB200	Vector de expresión derivado de pMRB187 donde se clonó el fragmento que incluye el promotor <i>PflhF</i> junto con la región codificante del gen. Permite la expresión de la proteína de fusión FlhF- <i>gfpmut3</i> bajo el control de su propio promotor. Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB201	Fusión transcripcional <i>PflgB1</i> con la secuencia FleQ1 mutada (<i>PflgB1</i> FleQmut1). Clonado en pMRB1. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB202	Fusión transcripcional <i>PflgB1</i> con la secuencia FleQ2 mutada (<i>PflgB1</i> FleQmut2). Clonado en pMRB1. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB203	Fusión transcripcional <i>PflgB1</i> con la secuencia FleQ3 mutada (<i>PflgB1</i> FleQmut3). Clonado en pMRB1. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB204	Fusión transcripcional <i>PflgB1</i> con la secuencia FleQ4 mutada (<i>PflgB1</i> FleQmut4). Clonado en pMRB1. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB205	Fusión transcripcional <i>PflgB1</i> con el promotor σ^{54} mutado (<i>PflgB1</i> prommut). Clonado en pMRB1. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB206	Fusión transcripcional de <i>PflgB</i> que contiene 392 pb aguas arriba del gen <i>flgB</i> (<i>PflgB1</i>). Clonado mediante sistema GATEWAY en pMRB3. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB207	Fusión transcripcional de <i>PflgB</i> que contiene 292 pb aguas arriba del gen <i>flgB</i> (<i>PflgB2</i>). Clonado mediante sistema GATEWAY en pMRB3. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB208	Fusión transcripcional de <i>PflgB</i> que contiene 196 pb aguas arriba del gen <i>flgB</i> (<i>PflgB3</i>). Clonado mediante sistema GATEWAY en pMRB3. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB209	Fusión transcripcional de <i>PflgB</i> que contiene 176 pb aguas arriba del gen <i>flgB</i> (<i>PflgB4</i>). Clonado mediante sistema GATEWAY en pMRB3. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo
pMRB210	Fusión transcripcional de <i>PflgB</i> que contiene 405 pb aguas arriba del promotor σ^{54} , en el que se han deletado 173 pb aguas abajo del promotor (<i>PflgB5</i>). Clonado mediante sistema GATEWAY en pMRB3. Ap ^r /Cb ^r .	Este trabajo

Materiales y métodos

pMRB230	Vector derivado de pMRB172 donde se clonó la región codificante de la proteína dTOMATO a continuación de la región SD descrita en (Elowitz & Leibler, 2000). Permite el marcaje de proteínas con dTOMATO en el extremo N-terminal. Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB233	Vector derivado de pDM4-Km que contiene la región codificante del gen <i>aer1</i> en fase con la secuencia de eYFP. Permite la expresión de la proteína de Aer1 fusionada a eYFP en su extremo C-terminal bajo el control de su propio promotor. Km ^r	(Sarand <i>et al.</i> , 2008)
pMRB234	Vector derivado de pDM4-Km que contiene la región codificante del gen <i>aer2</i> en fase con la secuencia de eYFP. Permite la expresión de la proteína de Aer2 fusionada a eYFP en su extremo C-terminal bajo el control de su propio promotor. Km ^r	(Sarand <i>et al.</i> , 2008)
pMRB236	Vector derivado de pMRB189 donde se clono la región codificante del gen <i>fimV</i> precedido de una región SD (Elowitz & Leibler, 2000). Permite la expresión de la proteína de fusión FimV- <i>gfpmut3</i> bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB239	Vector derivado de pMRB230 donde se clonó la región codificante del gen <i>pp4334</i> . Permite la expresión de la proteína de fusión dTOMATO-PP4334 bajo el control del sistema inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo.
pMRB250	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flgF</i> (pos. 4980210 a 4980710) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	Este trabajo.
pMRB259	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliE</i> (pos. 4960819 a 4961319) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB260	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliL</i> (pos. 4950785 a 4951372) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB261	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>pp4334 (parC)</i> (pos. 4924919 a 4925503) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB262	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>pp4328 (fliK)</i> (pos. 4917232 a 4917785) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB2. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB263	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>cheY</i> (pos. 4931088 a 4931740) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)

pMRB264	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flhA</i> (pos. 4936557 a 4937053) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB265	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flhF</i> (pos. 4934448 a 4934948) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Navarrete <i>et al.</i> , 2019)
pMRB266	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliK</i> (pos. 4952273 a 4952773) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB267	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>pp4364</i> (<i>hsbA</i>) (pos. 4954572 a 4955098) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB268	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliS</i> (pos. 4965988 a 4966549) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB269	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliD</i> (pos. 4967431 a 4968000) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB270	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliC</i> (pos. 4970173 a 4970728) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB271	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>motA</i> (pos. 5575910 a 5576496) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB272	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flgB</i> (pos. 4983420 a 4983997) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB273	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>cheV3</i> (pos. 4985457 a 4986031) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB274	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flgA</i> (pos. 4985457 a 4986031) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB2. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB275	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flgM</i> (pos. 4986340 a 4986828) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB2. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)

Materiales y métodos

pMRB276	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>cheA</i> (pos. 4930136 a 4930708) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB277	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fliH</i> (pos. 4957315 a 4957874) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Jiménez-Fernández <i>et al.</i> 2016)
pMRB278	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>flgZ</i> (pos. 4986506 a 4987081) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	(Velasco-Domínguez, sin publicar)
pMRB286	Vector derivado de pMRB172 que contiene la región codificante del gen <i>fliA</i> bajo el sistema de expresión inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB279	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> clonada en pMRB1 que contiene una inserción de 5 pb entre los posibles sitios de interacción FleQ 2 y 3. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB280	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> en pMRB1 que contiene una inserción de 11 pb entre los posibles sitios de interacción FleQ 2 y 3. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB281	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> en pMRB1 que contiene una inserción de 6 pb entre los posibles sitios de interacción FleQ 3 y 4. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB282	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> en pMRB1 que contiene una inserción de 11 pb entre los posibles sitios de interacción FleQ 3 y 4. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB283	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> en pMRB1 que contiene una inserción de 5 pb entre el posible sitio de interacción FleQ 4 y el promotor. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB284	Fusión transcripcional <i>PflgB1-gfp-lacZ</i> en pMRB1 que contiene una inserción de 11 pb entre el posible sitio de interacción FleQ 4 y el promotor. Ap ^r .	Este trabajo
pMRB286	Vector derivado de pMRB172 que contiene la región codificante del gen <i>fliA</i> bajo el sistema de expresión inducible por salicilato <i>nahR-Psal</i> . Ap ^r Gm ^r .	Este trabajo
pMRB287	Vector de integración pEMG donde se clonaron 500 pb aguas arriba y aguas abajo de la región codificante del gen <i>fimV</i> . Vector intermediario para la construcción del mutante de delección $\Delta fimV$. Km ^r .	Este trabajo

pMRB288	Vector de integración pEMG donde se clonaron 500 pb aguas arriba y aguas abajo de la región codificante del gen <i>pp4334</i> . Vector intermediario para la construcción del mutante de delección $\Delta parC$ ($\Delta pp4334$). Km ^r .	Este trabajo
pMRB290	Vector de integración pEMG donde se clonaron 500 pb aguas arriba y aguas abajo de la región codificante del gen <i>rpoN</i> . Vector intermediario para la construcción del mutante de delección $\Delta rpoN$. Km ^r .	Este trabajo
pMRB291	Fusión transcripcional de la región promotora del gen <i>fleS</i> (pos. 4961687 a 4962437) a <i>gfpmut3</i> y <i>lacZ</i> . Obtenido mediante la clonación de la región promotora en pMRB3. Ap ^r .	Este trabajo
pRK2013	Plásmido auxiliar en conjugaciones triparentales. Replicón ColE1. Tra ⁺ Km ^r .	(Figurski & Helinski, 1979)
pSW-I	Vector de expresión de I-SceI para la generación de deleciones cromosómicas en Gram-negativas. Ap ^r /Cb ^r .	(Martínez-García & de Lorenzo, 2011)
pTNS2	Plásmido auxiliar con origen de replicación R6K, aporta las funciones de transposición Tn7 en <i>trans</i> . Ap ^r Mob ⁺ .	(Choi <i>et al.</i> 2005)
pTYB12	Vector de clonación diseñado para la expresión y purificación de proteínas recombinantes usando el kit IMPACT. Ap ^r .	NewEngland Biolabs
pUC18SfimiT n7BBGm	Vector derivado de pUC18Sfi empleado para la integración mediante transposición mini Tn7. Ap ^r Gm ^r Mob ⁻ .	(Caballero & Govantes, sin publicar)
pYedQ	Vector derivado de pRK404A que expresa de forma heteróloga la diguanilato ciclasa YedQ procedente de <i>E. coli</i> . Originalmente designado pYhck	(Ausmees <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 03. Oligonucleótidos empleados durante el desarrollo de este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (de 5' a 3')	Uso
FimV-BamHI REV	ACGTGGATCCGACCAGCCGGGAGAGCAT	Proteína de fusión FimV-GFPmut3
FimV-SpeI-SD FWD	ACGTAAGTGAAGAGGAGAAATACTAGATGCTTCGAATTCGCAAACTG	Proteína de fusión FimV-GFPmut3
FleQ-REV-SpeI	GCATACTAGTATTATTATCAATCCTCCGCCTGGT	Expresión heteróloga FleQ
FleQ-SD-FWD-XbaI	ATGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGTGGCGTGAACCAAGA	Expresión heteróloga FleQ
fleR-UP-FWD-EcoRI	GGAAGAATTCCGCCACCCGCTCACT	Mutante delección $\Delta fleR$
fleR-UP-REV-BamHI	TTCAGGATCCACATTACCCCCCTCCGCCAA	Mutante delección $\Delta fleR$

Materiales y métodos

fleR-DOWN-FWD-BamHI	TTCAGGATCCAATGACTGGCAAATCATCTGCA	Mutante deleción $\Delta fleR$
fleR-DOWN-REV-HindIII	GTGGAAGCTTGAGGCCGATCTGGCG	Mutante deleción $\Delta fleR$
FlgF-prom SpeI FWD	ATGCACTAGTCAGAGCAACTACCAGGCCAAT	Fusión transcripcional <i>PflgF</i>
FlgF-prom-PstI REV	ATGCCTGCAGAGTTTCTCCTCTGCGCGTAGCT	Fusión transcripcional <i>PflgF</i>
FliH-fusion-BamHI REV	ACGTGGATCCACCCGCTCGCCGTGG	Proteína de fusión FliH-GFPmut3
FliH-fusion-SacI FWD	AGCTGAGCTCGAAAGAGGAGAAATACTAGATGCAAGTTAA GCGATTTTTCGC	Proteína de fusión FliH-GFPmut3
FliA-FWD-XbaI-SD	ATGCTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGAACGCCAG CGGCTT	Expresión heteróloga FliA
FliA-REV-SpeI-STOP	GCATACTAGTTCATCATCAACGCGCCCGCCATT	Expresión heteróloga FliA
FliE-prom-PstI REV	ATGCCTGCAGGACCCCTTCTCTCCTGCG	Fusión transcripcional <i>PfliE</i>
FliE-prom-SpeI FWD	ATGCACTAGTGCCATTCCATTGTGCGCT	Fusión transcripcional <i>PfliE</i>
FliN-fusion-BamHI REV	ACGTGGATCCGCGCAGCTTCTTGATACGTTCCG	Proteína de fusión FliN-GFPmut3
FliN-fusion-SpeI FWD	ACGTACTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAGATGCCTGTCTCGA GGAAATCATGG	Proteína de fusión FliN-GFPmut3
ParC-BamHI FWD	AGCTGGATCCTTGCGCGAGCTTTTCAATT	Proteína de fusión dTOMATO-ParC
ParC-STOP-KpnI REV	AGCTGGTACCTCATCAGGCTACCTGCACTGCGT	Proteína de fusión dTOMATO-ParC
Pbcs-FWD-HindIII-2	CCCCAAGCTTGTTGATCGCCAGCACCTGG	Sonda retardo
Pbcs-REV	GACTCATGTCAAAAAACGACAAAAATGA	Sonda retardo
PflgB-1 REV	GCCGAGCTCCCCGTAG	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-2 REV	CCGCTTTTGTACCTCAGG	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-3 REV	TGGTTGGCACAGCCCTT	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-4 REV	ATGCCTTGCTCAACGAAATT	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-5 FWD	CACCCATAGCAAGGGCTGTGCC	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut1 FWD	ATTTTTGTTTTAGATCTTTTCTAGACCATCAATTGCC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut1 REV	GGCAATTGATGGTCTAGAAAAGATCTAAAACAAAAAT	Mutagénesis <i>PflgB</i>

PflgB-FleQmut2 FWD	CGCCCATCAATTAGATCTTTCTAGACTCAGGCGGAAG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut2 REV	CTTCCGCCTGAGTCTAGAAAAGATCTAATTGATGGGCG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut3 FWD	CGGAAGGCCTTTAGATCTTTTCTAGAATCAATCTGACA	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut3 REV	TGTCAGATTGATTCTAGAAAAGATCTAAAGGCCTTCCG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut4 FWD	TGACAGTACCGCTCTAGAAAAGATCTTAAATACGGGCT	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FleQmut4 REV	AGCCCGTATTTAAGATCTTTTCTAGAGCGGTA CTGTCA	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-FWD	CACCATGTCACGGGCCTTGTAGTT	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB-preFleQ3mut FWD	CGCTTTTGTACCTCAGGTATGAGGCCTTTGCCGCTT	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-preFleQ3mut REV	AAGCGCAAAGGCCTCATACCTGAGGTGACAAAAGCG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-prommut FWD	TTTCCAGTGGTTAACACAGCCCTTGC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-prommut REV	GCAAGGGCTGTGTTAACCCTGGAAA	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB-REV-BamHI	AGCTGGATCCATGTCACGGGCCTTGTAGTT	Análisis deleción <i>PflgB</i>
PflgB1-FWD-EcoRI	AGCTGAATTCGCCGAGCTCCCCGTAG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-MedVuelta PosSitiosFleQ FWD	CCATAAATACGGGCTTTCCCTTTCCAGTGGTTGGCACAGCC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-MedVuelta PosSitiosFleQ REV	GGCTGTGCCAACCACTGGAAAGGAAAGCCCGTATTTATG G	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-Separacion 2-3 FWD	CCTCAGGCGGAAGACTAGGCCTTTGCCGC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-Separacion 2-3 REV	GCGGCAAAGGCCTAGTCTTCCGCCTGAGG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-Separacion3-4 FWD	GGCATCAATCTGGACTAACACAGTACCGCGC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-Separacion3-4 REV	GCGCGGTA CTGTTTAGTCCAGATTGATGCC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-vuelta completa 2-3-FWD	CCTCAGGCGGAAGACTAAGTAACGGCCTTTGCCGC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-vuelta completa 2-3-REV	GCGGCAAAGGCCGTTACTTAGTCTTCCGCCTGAGG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-vuelta completa 3-4-FWD	GGCATCAATCTGGACTAAGTAACACAGTACCGCGC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-vuelta completa 3-4 REV	GCGCGGTA CTGTTACTTAGTCCAGATTGATGCC	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PflgB1-VueltaComp PosSitiosFleQ FWD	CCATAAATACGGGCTTTCCGACTAGTTTCCAGTGGTTGGC ACAGCC	Mutagénesis <i>PflgB</i>

Materiales y métodos

PflgB1-VueltaComp PosSitiosFleQ REV	GGCTGTGCCAACCCTGGAACTAGTCGGAAAGCCCGTA TTTATGG	Mutagénesis <i>PflgB</i>
PlapA-1-FWD-HindIII	TGACAAGCTTCGACTGACTTCGGATTCC	Sonda retardo
PlapA-1 REV	AGCTATGTGTGCGCAAATCAA	Sonda retardo
PlapA-2 FWD	TTGATTTGCGACACATAGCT	Sonda retardo
PlapA-2-REV-BamHI	GCCCGGATCCATTGGACTCTCCGTGTGACC	Sonda retardo
PP-1993MutDOWN REV-BamHI	ACGTGGATCCCAGCACACCGGCAATGTTAC	Mutante deleción Δ <i>fimV</i>
PP1993UPDOWN Solapante FWD	GATTCATACAAGGGAAGAGGTCTGCAAGCAGGTCAGGC	Mutante deleción Δ <i>fimV</i>
PP1993UPDOWN Solapante REV	GCCTGACCTGCTTGCAGACCTCTCCCTTGTATGAATC	Mutante deleción Δ <i>fimV</i>
PP1993UPSTR-Sacl- KpnI FWD	ACGTGAGCTCGGTACCGTCATCGACCTGTCCGGC	Mutante deleción Δ <i>fimV</i>
PP-4334MutDOWN- FWD-BamHI	ACGTGGATCCGCTGCTCAAGCACCTGCT	Mutante deleción Δ <i>parC</i>
PP-4334MutDOWN- REV-XbaI	ACGTTCTAGAGACGACTTTTTTCATTCCCCTACC	Mutante deleción Δ <i>parC</i>
PP-4334MutUP-REV BamHI	ACGTGGATCCCAAGCAAACCTCTATCTATTGATTTGGC	Mutante deleción Δ <i>parC</i>
PP-4334UPSTR-FWD EcoRI-KpnI	ACGTGAATCCGGTACCGCTGGTCAAAGACAGCGAGC	Mutante deleción Δ <i>parC</i>
PstI-gfp REV	ACGTCTGCAGTTATTATTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA	Marcaje GFP C-terminal
rpoN-FWD-EcoRI	ACGTGAATTCGGGCATGAGCCTGTCTGG	Mutante deleción Δ <i>rpoN</i>
rpoN solapante FWD	GGTATTAAGCCCCTGCCATGCCCTGAGATGTGCCACA	Mutante deleción Δ <i>rpoN</i>
rpoN-solapant REV	TGTGGCACATCTCAGGGGCATGGCAGGGGCTTAATACC	Mutante deleción Δ <i>rpoN</i>
rpoN-REV-BamHI	ACGTGGATCCCGATGACAGTGGCGACCTTT	Mutante deleción Δ <i>rpoN</i>
SpeI-Sacl-SmaI-BamHI- gfp FWD	ACGTAAGTAGTGGCTCCCGGGGGATCCAGTAAAGGAGA AGAACTTTTCACTGG	Marcaje GFP C-terminal
SpeI-KpNI-EcoRI-BamHI- SmaI-dTOMATO REV	AGCTACTAGTGGTACCGAATTCGGATCCCGGGGCTTGT ACAGCTCGTCCATGCC	Marcaje dTOMATO N-terminal
SpeI-SD-dTOMATO FWD	AGCTACTAGTGAAAGAGGAGAAATACTAGGTGAGCAAGG GCGAGGAG	Marcaje dTOMATO N-terminal

2. Técnicas microbiológicas

2.1 Medios y condiciones de cultivo

Todas las estirpes empleadas en este trabajo se detallan en la tabla 01. Salvo que se indique lo contrario, todas ellas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) compuesto de 10 g/L triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl (Sambrook *et al.*, 1989). Para solidificar el medio se empleó agar bacteriológico (Panreac) a una concentración de 15 g/L. Se esterilizó mediante autoclave.

Cuando fue necesario, y con objeto de asegurar el mantenimiento y selección de plásmidos o marcadores cromosómicos, se añadieron los siguientes antibióticos: ampicilina (100 mg/L), carbenicilina (500 mg/L), kanamicina (25 mg/L), tetraciclina (5 mg/L), rifampicina (20 mg/L), cloranfenicol (15 mg/L), gentamicina (10 mg/L). Para bloquear la formación del septo de división durante los ensayos de microscopía se empleó cefsulodina 300 mg/mL. Para detectar actividad β -galactosidasa en medio sólido se empleó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) a una concentración de 25 mg/L. Cuando fue necesario, se empleó salicilato sódico como inductor a concentraciones de entre 0.1 y 2 mM.

Todas las estirpes de *Pseudomonas* usadas en este trabajo se incubaron a una temperatura de 30 °C, las estirpes de *E. coli* se incubaron a 37 °C. En el caso de cultivos líquidos con una agitación de 180 rpm.

2.2 Conservación de las estirpes bacterianas.

La conservación a largo plazo de las distintas estirpes se llevó a cabo mediante congelación a -80 °C en medio LB con glicerol al 15 % (v/v) como crioprotector.

2.3 Transferencia de ADN a estirpes bacterianas

2.3.1 Transferencia de plásmidos por conjugación triparental

La transferencia de plásmidos desde *E. coli* a *P. putida* se llevó a cabo por conjugación triparental, utilizando para ello la estirpe *E. coli* DH5 α con el plásmido auxiliar pRK2013 (Figurski & Helinski, 1979). Se partió de cultivos saturados en medio LB de las 3 estirpes implicadas: donadora (*E. coli* DH5 α con el plásmido de interés a movilizar), receptora (estirpe de *P. putida* donde queremos incorporar el plásmido) y auxiliar (estirpe de *E. coli* que porta los genes de transferencia). Estas se mezclaron en proporción 1:1:1 y se retiraron los antibióticos presentes en la mezcla mediante lavados sucesivos con LB. Finalmente, la mezcla se centrifugó y se resuspendió en 100 μ L de LB que se depositó en forma de gota (parche de conjugación) sobre LB sólido sin selección. Se dejó secar en

campana de flujo laminar y posteriormente se incubó a 30 °C durante al menos 6 horas antes de tomar biomasa con un asa de siembra y segregar en placas de LB con los antibióticos necesarios para la selección de la transferencia del plásmido. En los casos en los que el plásmido transferido aportó actividad β -galactosidasa se adicionó X-gal al medio.

Cuando la frecuencia de conjugación esperada fue baja, se resuspendió toda la biomasa del parche de conjugación en medio LB y se sembraron en medio selectivo las diluciones apropiadas.

2.3.2 Transferencia de plásmidos por transformación

2.3.2.1 Electrotransformación

2.3.2.1.A Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon células electrocompetentes de *P. putida* mediante el método descrito por Choi (Choi *et al.*, 2006). Se recogieron las células de un inóculo saturado de 3 mL de *P. putida* cultivado en LB durante toda la noche mediante repetidas centrifugaciones a 16100 g. Se realizaron 2 lavados con 1 mL de sacarosa 300 mM eliminando el exceso de sobrenadante, finalmente se resuspendieron en 100 μ L de sacarosa 300 mM para transformar de forma inmediata.

2.3.2.1.B Electroporación

Para la electrotransformación, las células se mantuvieron constantemente en hielo y se añadieron entre 100 y 500 ng de ADN en un volumen no superior a 10 μ L. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación con una distancia entre electrodos de 2 mm preenfriadas a -20 °C, que se sometió a una diferencia de potencial de 2,5 kV con una resistencia en paralelo de 200 Ω y 25 μ F con un equipo Micropulser TM (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso, se añadió 1 mL de medio SOC a temperatura ambiente (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0.5 g/L de NaCl, 1.25 mM de KCl; a pH 7, más 10 mM de MgCl₂ y 2.5 g/L de glucosa añadidos en el momento), se incubó entre 60 y 90 minutos a 30 °C, y se sembró en medio selectivo.

2.3.2.2 Transformación por choque térmico de *E. coli*

2.3.2.2.A Preparación de las células competentes

Método 1: Preparación de células competentes con una alta frecuencia de transformación

Con el fin de obtener una alta frecuencia de transformación (hasta 10⁹ transformantes por μ g de ADN plasmídico) se siguió el protocolo descrito por Inoue y

colaboradores (Inoue *et al.*, 1990). Un cultivo saturado de *E. coli* DH5 α se diluyó 100 veces en 200 mL de medio SOC (más 10 mM de MgCl₂ y 2.5 g/L de glucosa añadidos en el momento) y se incubó con agitación a 22 °C hasta alcanzar una densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm (A₆₀₀) de 0.5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo, donde se mantuvo durante 10 minutos. A continuación, se recogieron las células mediante centrifugación a 2500 *g* a 4 °C durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 mL de TB (PIPES 10 mM, CaCl₂·2H₂O 15 mM, KCl 250 mM). Ajustando el pH a 6.7 con KOH. Posteriormente se añadió MnCl₂·4H₂O 55 mM y se esterilizó por filtración a 0 °C, se añadieron otros 60 mL de TB a 0 °C y se incubó 10 minutos en hielo. Se recogieron las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 20 mL de TB a 0 °C. Se añadieron 1.5 mL de DMSO y, tras incubar 10 minutos en hielo, se prepararon alícuotas de 0.3 y 0.5 mL, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Método 2: TSS

Para transformaciones en las cuales se pretendía transferir el plásmido a estirpes diferentes a DH5 α se empleó el método de baja eficiencia descrito por (Chung *et al.*, 1989). Para cada transformación, se centrifugó a 13000 rpm 1 mL de cultivo en fase exponencial. Se resuspendió el sedimento en 75 μ L de medio LB previamente enfriado en hielo y se incubó en hielo durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 75 μ L de medio TSS 2X previamente enfriado en hielo (8 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 200 g/L polietilenglicol 8000, 10 % DMSO (v/v), 100 mM MgSO₄ a pH 6.5) y la mezcla se incubó en hielo otros 5 minutos.

2.3.2.2.B Transformación

Para transformar las células competentes se añadió una alícuota de 1-5 μ L de una preparación del plásmido o 10 μ L en el caso de reacciones de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y a continuación se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos. Se devolvió rápidamente a hielo y se añadió 1 mL de LB a temperatura ambiente. Se incubó a 37 °C durante 60-90 minutos, se sembró en placas de medio selectivo y se incubó toda la noche a dicha temperatura.

2.4 Análisis de la expresión génica

2.4.1 Ensayo β -galactosidasa

Las estirpes de *P. putida* que contenían las fusiones génicas al gen *lacZ* a ensayar se incubaron a 30 °C en medio LB hasta que los cultivos estuvieron saturados. Posteriormente, se diluyeron a una A_{600} aproximada de 0.01 y se volvieron a incubar a 30 °C durante 24 horas hasta fase estacionaria. Transcurrido este tiempo, se realizó una dilución 1:20 del cultivo en tampón fosfato (Na_2HPO_4 40 mM, KH_2PO_4 20 mM, NaCl 8.5 mM), se midió la A_{600} y la actividad β -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito por Miller (Miller, 1972). Se tomaron 50 μL de la dilución del cultivo y se mezclaron en hielo con 705 μL de tampón Z con β -mercaptoetanol recién añadido (Na_2HPO_4 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, β -mercaptoetanol 0.27 % (v/v)), 30 μL de cloroformo y 15 μL de SDS 0,1 % (p/v). La mezcla se homogeneizó usando vortex y se incubó unos minutos en un baño a 30 °C antes de añadir 200 μL de ONPG 13 mM (o-nitrofenil galactopiranosido, preparado en tampón Z). Se volvió a homogenizar en el vórtex y se prosiguió la incubación a 30 °C hasta que la mezcla adquirió color amarillo, momento en el que se paró la reacción añadiendo 500 μL de carbonato sódico (Na_2CO_3) 1 M, agitándola y poniéndola en hielo. Se midió el tiempo transcurrido entre la adición de ONPG y la finalización de la reacción con carbonato cálcico para cada una de las reacciones, se centrifugó la mezcla 15 minutos a 10000 g y se midió el color amarillo del sobrenadante en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm (A_{420}).

Para calcular la actividad β -galactosidasa de cada muestra en unidades Miller se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta - \text{galactosidasa (Unidades Miller)} = \frac{A_{420}}{V \cdot A_{600} \cdot t} \cdot 1000$$

Donde:

A_{420} : Absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 420 nm.

V: Volumen de cultivo utilizado en la reacción (mL).

A_{600} : Densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm.

t: Tiempo de reacción (minutos).

2.4.2 Ensayo fluorimétrico

2.4.2.1 Obtención de datos

Para estudiar la expresión de promotores fusionados a *gfp* a lo largo de la curva de crecimiento exponencial, se realizaron ensayos de fluorimetría. Se empleó un fluorímetro TECAN Spark 100M, en el que se incubaron un mínimo de 3 réplicas biológicas de cada uno de los promotores a ensayar. La incubación se realizó en medio LB y a una temperatura de 30 °C hasta que los cultivos se encontraron en fase estacionaria. Posteriormente, se realizó una dilución 1:250 en medio LB diluido al 10 % (v/v) y se dispusieron 150 µL de cada muestra en una placa de 96 pocillos (Costar microtiter polystyrene) apta para su ensayo en fluorímetro. Se incubaron a 30 °C con agitación fuerte (510 rpm) en el fluorímetro tomando medidas de A_{600} a intervalos regulares de 15 minutos. Transcurridas entre 4 y 6 horas y tras comprobar que todas las muestras se encontraban en fase exponencial, se realizó una segunda dilución 1:100 en LB 10 % (v/v). Se incubaron 23 horas a 30 °C midiendo A_{600} y fluorescencia en el rango de la GFP (excitación: 485 nm, emisión: 535 nm) a intervalos de 15 minutos.

2.4.2.2 Análisis de los datos obtenidos

Los datos del ensayo fluorimétrico se procesaron para mostrar la expresión relativa de cada uno de los promotores por unidad de tiempo durante la fase exponencial del crecimiento. Se representó la A_{600} frente a los valores de fluorescencia para cada uno de los tiempos registrados. Durante la fase exponencial, esta representación genera una nube de puntos que se ajusta fielmente a una recta de regresión ($R^2 > 0,95$ para la mayoría de los casos). Se calculó el valor de la pendiente de esta recta para cada una de las réplicas biológicas del promotor ensayado y se calculó la media y la desviación de los datos. Este valor se denominó tasa de acumulación diferencial de GFP.

2.5 Análisis fenotípicos

2.5.1 Ensayos de movilidad en agar blando o movilidad tipo *swimming*

Para los ensayos de natación de las diferentes estirpes de *P. putida* se preparó medio semisólido de *swimming* (10 mg/mL bactotripton, 5 mg/mL NaCl, 3 mg/mL bactoagar) esterilizado mediante autoclave. Una vez autoclavado, se dispensó en placas sin dejar enfriar y se taparon inmediatamente para minimizar la evaporación. El medio se dejó solidificar durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se inocularon las placas mediante la picadura de una colonia en el interior del medio. Se incubaron entre 12 y 16 horas a 30 °C y se midió el diámetro de los halos. Los resultados se expresaron en relación al halo formado por la estirpe silvestre.

2.5.2 Ensayos de movilidad en superficie tipo *swarming*

Los ensayos de movilidad tipo *swarming* se realizaron sobre placas de medio PG-agar (5 mg/mL bactopectona, 5 mg/mL bactoagar) suplementado con glucosa 0.1 % estéril después de ser autoclavado. Tras dispensar las placas, se solidificaron durante al menos 4 horas, tapadas y a temperatura ambiente para evitar la evaporación excesiva. Transcurrido este tiempo se sembraron sobre la superficie de la placa gotas de 2.5 μ L de cultivo saturado de las estirpes a ensayar en medio LB. Las placas se sellaron con Parafilm para retener la humedad y se incubaron a 25 °C durante 72 horas.

2.5.3 Ensayos de quimiotaxis

Los ensayos de quimiotaxis por halo de concentración se realizaron siguiendo el protocolo de Tso y Adler (1974) con algunas modificaciones. Se centrifugaron a baja velocidad (3000 g) durante 10 minutos cultivos saturados en medio LB de cada una de las estirpes a ensayar, posteriormente se realizaron 2 lavados con tampón de quimiotaxis 2X (tampón fosfato 1M (pH 7), glicerol 0.10 % (v/v), EDTA 20 μ M) para eliminar los restos de medio. Tras los lavados, se ajustó la A_{600} a 1,5 usando tampón de quimiotaxis 2X. Una vez ajustado, se mezcló en proporción 1:1 con agar noble 0.5 % (p/v) previamente atemperado en un baño a 40 °C. La mezcla se agitó con suavidad y se dispensó en placas. En el centro de las placas se incorporó un disco de agarosa 2 % (p/v) con la sustancia quimioatrayente a ensayar. Como control negativo se usó un disco sin quimioatrayente.

Los halos de concentración formados en torno al disco fueron escaneados periódicamente durante las 4 horas posteriores al ensayo usando un escáner de placas Image Scanner III (GE Healthcare). Las imágenes se procesaron usando el software ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

2.5.4 Tinción de flagelos

La tinción flagelar se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en (Clark, 1976) con ligeras modificaciones. Para incrementar el porcentaje de células con flagelo se resuspendió biomasa procedente de placas de *swarming* en una solución de $MgCl_2$ 10mM y se ajustó la A_{600} a 1. Las células se fijaron mediante la mezcla en proporción 1:1 con una solución fijadora (paraformaldehído 4% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.2) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó correr una gota de suspensión bacteriana fijada sobre un portaobjetos de cristal previamente tratado con una solución de HCl 3 % en etanol. Se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se tiñeron con solución de tinción (fucsina básica 1.2% (p/v) en etanol 95 %, NaCl 0.75 % (p/v), ácido tánico 1.5 % (v/v)) a temperatura ambiente durante 40 minutos. El excedente se retiró

con agua destilada y las muestras se montaron con Merckoglass para evitar su deterioro. Se tomaron imágenes usando el microscopio óptico confocal Nikon A1.

2.6 Ensayos de localización de proteínas fluorescentes

Para los ensayos de localización de proteínas marcadas fluorescentemente se incubaron las estirpes de estudio en medio sólido LB con la selección adecuada a 30 °C. Una vez crecidas las colonias, se inocularon en medio líquido LB y se incubaron a 30 °C con agitación hasta fase estacionaria. Los cultivos saturados se diluyeron entre 250 y 500 veces en medio LB, adicionando salicilato sódico como inductor cuando fue necesario. Se incubaron durante 2-3 horas hasta fase exponencial temprana (A_{600} aproximada de 0.3). Transcurrido este tiempo, se dispusieron 200 μ L del cultivo en placas de 8 pocillos μ -Slide (Ibidi) y se incubaron durante 20 minutos en estático a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con LB diluido al 10 % (v/v) para retirar las células en suspensión dejando únicamente aquellas adheridas al soporte.

Cuando fue necesario trabajar con células incapaces de adherirse al material se empleó un soporte de agarosa 1.8 % (p/v) sobre el que se vertió una dilución 1:100 del cultivo en fase exponencial. Para el estudio de la localización de proteínas en células sin septo, previamente a su visualización en el microscopio, se añadió cefsulodina a una concentración de 300 mg/mL.

Las muestras se observaron en el microscopio confocal de fluorescencia Nikon A1 y en el microscopio de fluorescencia Leica DMI8. Se tomaron imágenes de contraste de fases y de fluorescencia en el rango de GFP (excitación: 485 nm, emisión: 535 nm), dTOMATO (excitación: 554 nm, emisión: 581 nm) o eYFP (excitación: 513 nm, emisión: 527 nm), según el fluoróforo empleado. Los tiempos de excitación de las muestras variaron desde 25 milisegundos a 1 segundo según las necesidades. Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante el software de procesamiento de imágenes Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

2.7 Ensayos de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP)

Cuando fue necesario estudiar la capacidad de ciertas proteínas de acumularse diferencialmente en determinadas etapas del ciclo celular se llevaron a cabo ensayos de recuperación de la fluorescencia tras *photobleaching*, también conocido como FRAP. La preparación de las muestras se realizó siguiendo los pasos detallados en el apartado 2.6. Una vez localizada la región de interés, se aplicó un pulso láser sobre la zona para eliminar la fluorescencia mediante fotoblanqueo y se monitorizó su reaparición tomando imágenes a intervalos regulares.

3. Técnicas moleculares

3.1 Manipulación de ácidos nucleicos

3.1.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Las preparaciones de ADN plasmídico de *E. coli* DH5 α a pequeña escala se realizaron siguiendo el protocolo simplificado de lisis alcalina (Jones & Schofield, 1990). El sedimento de células procedente de 3 mL de cultivo saturado en LB, se resuspendió en 100 μ L de solución GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8)) y se incubó 5 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 200 μ L de solución II recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS 1 % (p/v)), mezclando por inversión e incubando 5 minutos en hielo. Después se añadieron 150 μ L de solución III (acetato potásico 3 M pH 4,8), y se mezcló por inversión, incubándose al menos otros 5 minutos en hielo. Los restos celulares se eliminaron por sedimentación centrifugando durante 10 minutos a 16100 g, y el ADN presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo 1 volumen de etanol 96 % (v/v) a -20 °C, centrifugando inmediatamente durante 10 minutos a 16100 g. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70 % (v/v) frío, y se centrifugó 2 minutos a 16100 g. Dicho precipitado se secó a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos y se resuspendió en TER (Tris HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1mM (pH 8) con 20 mg/L de ribonucleasa). Las preparaciones de plásmidos se almacenaron a 4 °C o -20 °C para su conservación a largo plazo.

Cuando fue necesario una gran pureza en la preparación de ADN plasmídico, cuando la estirpe de la que extraíamos ADN plasmídico no era DH5 α o en muestras para secuenciar o clonar, se empleó el kit Nucleospin Plasmid Mini (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.2 Extracción de ADN genómico de *P. putida* KT2442

Las extracciones de ADN cromosómico de *P. putida* se realizaron con el kit Wizard Genomic ADN Purification (Promega), partiendo de las células recogidas por centrifugación a 16100 g de 1 mL de cultivo saturado en medio LB.

3.1.3 Electroforesis de ADN

Para separar y visualizar fragmentos lineales de ADN se empleó la técnica de electroforesis en gel. Por norma general, si el tamaño del fragmento de interés era superior a 100 pb se utilizaron geles de agarosa de baja electroendoósmosis, cuya concentración osciló entre 0.8 % y 2 % (p/v) dependiendo de los tamaños a separar, en

tampón TAE 1X (Tris-ácido acético 40 mM, EDTA 2 mM (pH 7.7)). Estos geles se sometieron a una diferencia de potencial fija de entre 90 y 120 V.

Por el contrario, si el tamaño del fragmento de interés era inferior a 100 pb se usaron geles verticales no desnaturalizantes de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en TBE 0.5X (Tris-ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM (pH 8.3)). La concentración de los geles varió entre el 5 % y el 8 % (v/v) para una mejor resolución en función del tamaño del fragmento. Los geles se sometieron a una corriente fija de 30 mA.

En ambos casos, se utilizó el marcador de comercial 1 Kb Plus ADN Ladder (Invitrogen). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se mezclaron con 1/6 del volumen final de tampón de carga (Tris-HCl 10 mM (pH 8); EDTA_{Na} 1 mM (pH 8); glicerol 30 % (v/v), azul de bromofenol 0.25 % (p/v) y xylene cyanol 0.25 % (p/v)). Después de la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio 1 mg/L y las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron y cuantificaron con una cámara acoplada a una impresora de impresión térmica Sony UP-895.

3.1.4 Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos se identificaron mediante visualización en geles de agarosa a la concentración adecuada y se purificaron con el kit GFX (GE healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.5 Cuantificación de ADN

Para cuantificar las distintas preparaciones de ADN de doble cadena (ADN plasmídico, fragmentos de ADN purificados, ADN total, etc.) se midió la absorbancia a 260 nM en un espectrofotómetro Nanodrop One, que calculó la concentración aplicando un coeficiente de extinción de 50 ng cm μL^{-1} .

3.1.6 Clonación de fragmentos de ADN

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron adquiridas a la compañía Roche o New England Biolabs. En cada caso, se siguieron las recomendaciones del proveedor y se empleó el tampón de restricción suministrado por la casa comercial junto a la enzima de restricción.

Las ligaciones se realizaron con la ligasa de T4 y tampón de ligación de la casa comercial New England Biolabs siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron durante al menos 12 horas a 16 °C antes de la transformación.

3.1.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias de ADN de interés fueron realizadas con la enzima Biotaq DNA polymerase (Bioline) o Q5 High-fidelity polymerase (New England Biolabs), en función de la calidad del producto de PCR requerido. En determinadas ocasiones se utilizó el kit Illustra™ PureTaq™ Ready-to-Go™ PCR beads (GE Healthcare).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 o 50 µL en tubos de 0,2 mL, en presencia de los oligonucleótidos adecuados a una concentración final de 0.5 µM, dNTPs a 200 µM y 1 unidad de ADN polimerasa, en el tampón que suministra la casa comercial, que contiene MgCl₂ a una concentración final de 2 mM. Para amplificaciones ricas en GC se incorporó una solución *enhancer* suministrada por el fabricante. Como molde se usó, según el caso, entre 10 y 50 ng de ADN cromosómico de *P. putida* o entre 1 y 10 ng de ADN plasmídico.

El programa de PCR del termociclador Biometra T-personal varió en función del tamaño y naturaleza del fragmento a amplificar. Se siguieron las indicaciones del fabricante en cada caso.

Para amplificar fragmentos de ADN directamente desde una colonia bacteriana, se sustituyó la adición de ADN por una pequeña cantidad de biomasa en la mezcla de reacción. En otras ocasiones, se resuspendió una colonia en 25 µL de H₂O estéril y se hirvió durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó y se usó 1 µL del sobrenadante como molde para la reacción de amplificación.

Los oligonucleótidos usados durante este trabajo fueron sintetizados por la empresa Sigma y se detallan en la tabla 03.

3.1.8 Mutagénesis dirigida por PCR solapante

La técnica de PCR solapante se empleó cuando se necesitaron generar mutaciones dirigidas y no existían dianas de restricción para ello. Los cambios de secuencia introducidos mediante PCR solapante se detallan en la tabla 05. En esta técnica se realizan en primer lugar dos amplificaciones independientes, cada una de ellas con un oligonucleótido mutagénico interno, es decir, conteniendo la mutación que queremos introducir y uno no mutagénico externo. Los oligonucleótidos mutagénicos solapan en una zona de unos 15 nucleótidos que contiene la secuencia que se desea mutar, y se extienden otros 15-20 nucleótidos en ambas direcciones, complementarios a la región a amplificar. En la primera ronda de PCR, los cebadores mutagénicos dirigen la polimerización en direcciones divergentes hasta los extremos de la región de interés

donde se localizan los oligonucleótidos externos. Se generan así dos productos de PCR que comparten únicamente la secuencia común entre ambos oligonucleótidos internos en las que se localiza la secuencia mutada. Una vez purificados, los productos de las primeras reacciones se mezclan y se emplean como molde para una segunda PCR en la que solo se utilizan como cebadores los dos oligonucleótidos externos. En los primeros ciclos de amplificación, tras la desnaturalización inicial, una determinada proporción de los fragmentos de ADN hibridan por el extremo común, que es la región que contiene las mutaciones, y funcionan como cebadores para la amplificación en direcciones divergentes. En los ciclos de amplificación posteriores, los oligonucleótidos externos permiten amplificar desde los extremos toda la secuencia, que ya contiene las mutaciones deseadas. Una representación esquemática del proceso se muestra en la figura 09.

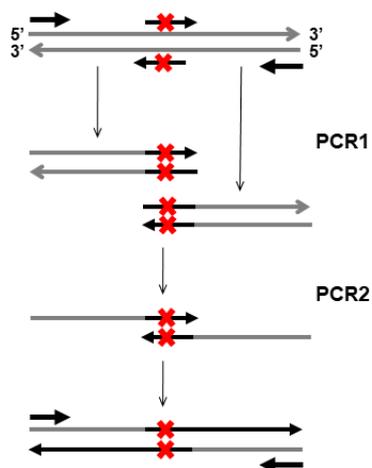


Figura 09. Esquema de una PCR solapante. Las flechas con aspa roja representan los oligonucleótidos que contienen las mutaciones, mientras que las flechas anchas representan los oligonucleótidos externos.

3.1.9 Secuenciación

El servicio de secuenciación fue llevado a cabo por las empresas Secugen (Madrid) y Stabvida (Lisboa). Para la comparación de las secuencias con las bases de datos, el análisis de las pautas abiertas de lectura así como el alineamiento de secuencias se utilizó el paquete de herramientas BLAST (Altschul *et al.* 1997) disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.1.10 Expresión de proteínas fusionadas a fluorocromos

Con el fin de localizar proteínas *in vivo* en ensayos de microscopía, se construyeron vectores para generar proteínas fusionadas a diferentes fluorocromos tanto en el extremo N-terminal como C-terminal. Se partió del vector pMRB172, portador del sistema de transposición específica de sitio miniTn7, el sistema de expresión inducible por salicilato *nahR-Psal* y el gen de resistencia a gentamicina. En el caso de los vectores

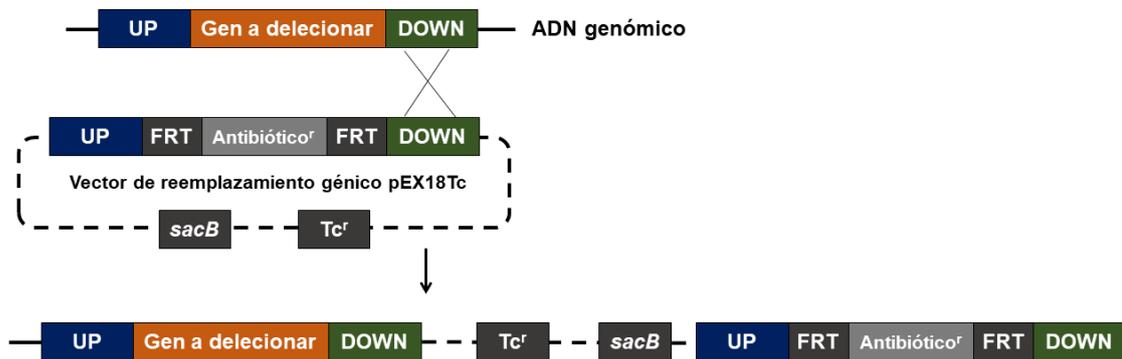
para el marcaje en C-terminal, se amplificaron los genes *gfpmut3* o *dTOMATO* junto con un sitio múltiple de clonación en su extremo 5'. Para el marcaje en N-terminal, se amplificó un fragmento que contenía la región codificante de *gfpmut3* o *dTOMATO* (eliminando el codón de STOP) seguido de un sitio múltiple de clonación en su extremo 3'. En ambos casos el fragmento amplificado se clonó aguas abajo del promotor inducible *P_{sal}*. La región codificante de las proteínas de interés se amplificó mediante PCR flanqueada con sitios de restricción que permitieron su clonación en el vector deseado en cada caso. Las construcciones se transfirieron a *P. putida* KT2442 mediante electroporación y posterior selección en placas con gentamicina. Su integración en el genoma fue comprobada por PCR.

3.2 Construcción de mutantes de delección

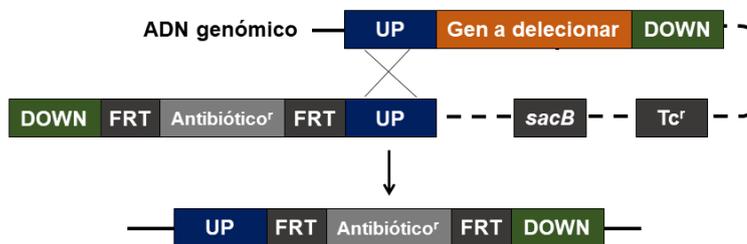
3.2.1 Método mediado por flipasa (FRT)

Para construir algunos de los mutantes de delección en *P. putida* se siguió el protocolo desarrollado por Hoang y col. (Hoang *et al.* 1998). Entre 800 y 1000 pb de las regiones flanqueantes, tanto aguas abajo como aguas arriba, del gen a deleccionar, fueron amplificadas por PCR y clonadas mediante ligación triple en el vector pEX18Tc, que porta genes de resistencia a tetraciclina y sensibilidad a sacarosa. Posteriormente, se clonó un cassette de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones FRT entre las regiones *upstream* y *downstream*. Esta construcción se transfirió a *P. putida* mediante electroporación, seleccionándose posteriormente aquellos candidatos resistentes a kanamicina, tetraciclina y sensibles a sacarosa, en los que el plásmido se integró mediante un evento de recombinación (Fig. 10, primera recombinación). Para fomentar el segundo evento de recombinación necesario para la sustitución alélica, los candidatos positivos fueron cultivados en LB hasta fase estacionaria y posteriormente sembrados en placas con selección a kanamicina y sacarosa. Esta combinación de marcadores asegura que el segundo evento de recombinación ha tenido lugar y se han perdido los genes de resistencia a tetraciclina y sensibilidad a sacarosa que porta el plásmido (Fig. 10, segunda recombinación). Para eliminar el gen de resistencia a kanamicina que se encuentra flanqueado por secuencias FRT, se transfirió mediante electroporación el plásmido pFLP2 que expresa la enzima flipasa de forma constitutiva (Fig. 10, recombinación por flipasa). Posteriormente, se comprobó la resistencia de las colonias resultantes a kanamicina, tetraciclina, y sacarosa. Los candidatos con el patrón de resistencias correcto perdieron el plásmido pFLP2 tras varios pases en medio LB líquido sin selección. La delección del fragmento fue comprobada por PCR.

Primera recombinación



Segunda recombinación



Recombinación por flipasa

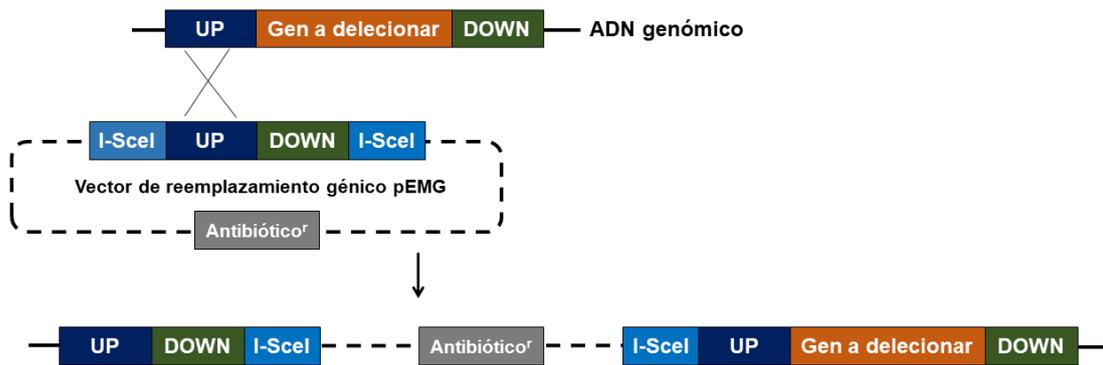


Figura 10. Esquema de los pasos seguidos para la generación de mutantes de deleción mediante el método mediado por flipasa. Un gen de resistencia a antibiótico flanqueado por regiones FRT y las secuencias aguas arriba (UP) y aguas abajo (DOWN) del gen a deletar se clonan en el vector de reemplazamiento génico pEX18Tc. En un primer evento de recombinación homóloga, el plásmido queda integrado en el cromosoma (en la figura la primera recombinación se produce a partir de la región *downstream*). Un segundo evento de recombinación en la región *upstream* elimina el resto de la estructura del plásmido, así como el gen a deletar. Finalmente, la enzima flipasa cataliza la recombinación de las secuencias FRT eliminando el gen de resistencia a antibiótico y dejando una pequeña cicatriz.

3.2.2 Método de delección sin cicatriz

Para la construcción de mutantes sin cicatriz se siguió el protocolo desarrollado por Martínez-García y de Lorenzo (Martínez-García & de Lorenzo, 2011). Se amplificaron mediante PCR entre 500 y 750 pb de las regiones flanqueantes tanto aguas arriba como aguas abajo del gen o región a deleccionar. Estos fragmentos se clonaron mediante ligación triple en el vector pEMG que deja dianas de restricción I-SceI a ambos lados del fragmento clonado y porta el gen de resistencia a kanamicina. Este plásmido se transfirió mediante conjugación triparental a las estirpes de interés y se seleccionó la co-integración del vector mediante selección en kanamicina (Fig. 11, primera recombinación). Más tarde, se transfirió mediante conjugación triparental el plásmido pSW-I a los candidatos positivos. Este plásmido expresa la enzima de restricción I-SceI bajo el control de un promotor inducible por 3-metil-benzoato (3MB) y porta el gen de resistencia a carbenicilina. Para inducir la expresión de I-SceI, se diluyó un cultivo saturado hasta una A_{600} de 0.5 en medio LB y se adicionó 3-metil-benzoato 15 mM como inductor. Se incubó a 30 °C durante 12 horas con agitación y se sembraron diluciones seriadas en placas con carbenicilina. En el genoma de *P. putida* KT2442 no existen sitios de restricción reconocidos por I-SceI y únicamente se encuentran presentes tras la integración del vector. La acción de la enzima I-SceI sobre los co-integrados genera cortes de doble cadena en el ADN que resultan letales a menos que sean reparados por procesos de recombinación homóloga (Fig. 11, corte de doble cadena). Tras el proceso de recombinación, el genoma puede revertir hacia su estado silvestre o generar la delección buscada sin cicatriz. La delección de los fragmentos fue comprobada mediante PCR en las colonias obtenidas. El plásmido pSW-I fue posteriormente eliminado de los candidatos positivos mediante sucesivos pases en medio LB líquido sin selección.

Primera recombinación



Corte de doble cadena en el ADN mediado por I-SceI

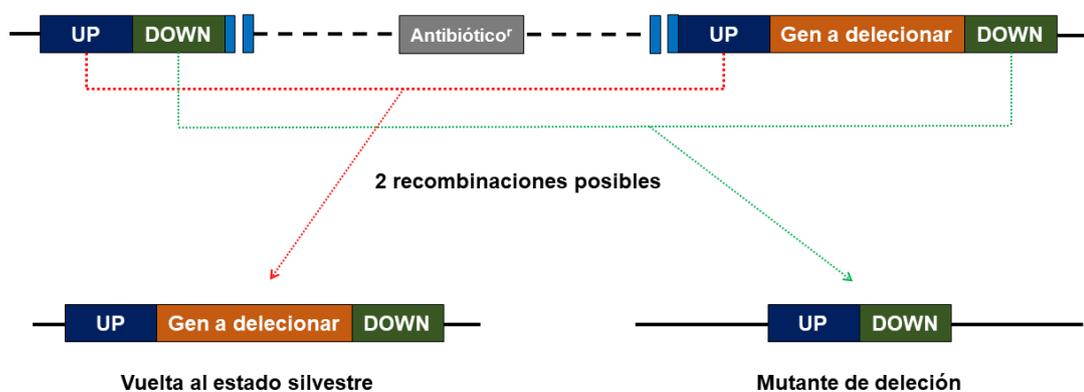


Figura 11. Esquema de los pasos seguidos para la generación de mutantes de delección sin cicatriz.

Las regiones aguas abajo (**DOWN**) y aguas arriba (**UP**) del gen a deleccionar se clonan en el vector de reemplazamiento génico pEMG. En un primer evento de recombinación, el plásmido completo queda integrado en el genoma (en la figura la primera recombinación se produce a partir de la región *upstream*). La inducción de la enzima I-SceI provoca cortes de doble cadena en la secuencia del plásmido integrado y fuerza un segundo evento de recombinación para su reparación. El segundo evento de recombinación puede revertir la secuencia al estado silvestre o puede generar mutantes de delección sin cicatriz.

3.3 Clonación mediante sistema Gateway™

Para la construcción de la librería de promotores y análisis de delección de la región promotora de *flgB* se hizo uso del sistema de clonación GATEWAY. Las regiones intergénicas susceptibles de contener promotores de interés se amplificaron mediante PCR usando oligonucleótidos que aportaron una secuencia CACC en el extremo 5'. Estos amplicones fueron directamente clonados en el vector pENTR™/D-TOPO, un vector de clonación direccional en el sistema GATEWAY que no requiere de la acción de enzimas de restricción ni ligasas. Posteriormente, los fragmentos de interés fueron transferidos por acción de la clonasa LR™, siguiendo las instrucciones del fabricante, a los vectores de expresión pMRB2 o pMRB3, que portan el cassette *attR1-Cm^r-ccdB-attR2* en ambas orientaciones y los genes reporteros *gfpmut3* y *lacZ*.

3.4 Purificación de proteínas mediante sistema IMPACT

3.4.1 Superproducción de proteínas

Cuando el objetivo fue superproducir una proteína de interés se usó la estirpe *E. coli* NCM631 transformada previamente con el plásmido pIZ227, que contiene un sistema de expresión basado en la ARN polimerasa de T7 (Govantes & Santero, 1996). Los genes de las proteínas a superproducir se clonaron en el vector pTYB12 que genera proteínas fusionadas a inteína en el extremo N-terminal y permite la utilización del kit de purificación de proteínas IMPACT (New England Biolabs). Como control negativo se usó el vector de superproducción vacío (pTYB12).

Los inóculos saturados de las estirpes transformadas se diluyeron 100 veces en 1 L de LB. Se incubaron en agitación a 37 °C hasta que la A_{600} alcanzó un valor aproximado de 0.3 y se atemperó a 15 °C durante el tiempo necesario para alcanzar una A_{600} de 0.35-0.4. En ese momento se añadió IPTG a los cultivos a una concentración final de 0.3 mM y se incubaron a 16 °C durante 12-16 h.

Para la preparación de extractos, se recogieron las células por centrifugación a 4 °C y 8.000 g durante 15 minutos. Las células se resuspendieron en *column buffer* con triton X-100 (Tris-HCl (pH 8) 20mM, KCl 250 mM, EDTA 0.1 mM, Triton X-100 0.1 % (v/v)).

La rotura de las células se llevó a cabo mediante sonicación. Se repitieron ciclos alternos de encendido-apagado con un periodo de 2 segundos durante 10 minutos, manteniendo la muestra en hielo. Tras la rotura, las muestras se centrifugaron a 4 °C y 15000 g durante 30 segundos. El sobrenadante se conservó a -20 °C.

3.4.2 Purificación de proteínas

El sistema de purificación de proteínas IMPACT (New England Biolabs) permitió obtener proteínas con una pequeña cola de 3 residuos en su extremo N-terminal. Su funcionalidad se basa en la interacción quitina-inteína y en la capacidad de autocorte presente en la inteína.

Se hizo pasar el extracto de superproducción que contenía la proteína de interés fusionada a inteína por una columna de afinidad a quitina, previamente tratada según las instrucciones del fabricante. Se realizaron dos lavados consecutivos haciendo pasar 50 mL de *column buffer* para eliminar uniones inespecíficas. Posteriormente, se indujo el autocorte de la inteína mediante la adición de 15 mL de *column buffer* con DTT 50 mM. Se incubó 16 horas a temperatura ambiente para asegurar el corte y finalmente se recogió todo el volumen de la columna. Para disminuir la concentración de DTT tras la elución de la proteína, se llevó a cabo un proceso de diálisis hasta obtener la proteína de interés en tampón de conservación (Tris-HCl (pH 8) 20mM, KCl 250 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 50 % (v/v), DTT 2mM).

La concentración de proteínas se determinó usando un método basado en el descrito por Bradford (Bradford, 1976) usando el reactivo Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad). Las proteínas se conservaron a -80 °C.

3.4.3 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS 0.1 % (p/v), según el método descrito en (Laemmli, 1970). La electroforesis de las muestras se llevó a cabo en geles discontinuos consistentes en un gel superior de empaquetamiento (Tris HCl 0.5M pH 6.8, acrilamida:bis-acrilamida (37,5:1) al 4.5 % (v/v), SDS 0.1 % (p/v), persulfato amónico 0.033 % (p/v), TEMED 0.067 % (v/v)) y un gel inferior de separación (Tris HCl 1.5M pH 8,8, acrilamida:bis-acrilamida (37.5:1) desde el 7.5 al 15 % (v/v) según el tamaño de la proteína, SDS 0.1 % (p/v), persulfato amónico 0.033 % (p/v), TEMED 0.067 % (v/v)). La electroforesis se realizó en *tank buffer* (Trizma base 25 mM, glicina 19.2 mM y SDS 0.1 % (p/v)) a una intensidad de corriente fija de 30 mA. El gel se lavó brevemente con agua destilada y se tiñó con EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se lavó dos veces con agua para aumentar el contraste entre las proteínas teñidas y el resto del gel y se secó en un secador de geles Hoefer™ Slab Gel Dryer CD 2000 (GE Healthcare) durante 45 minutos a 80 °C.

3.5 Ensayo de retardo de movilidad en gel

3.5.1 Marcaje de las sondas

Los fragmentos de ADN para el análisis de la interacción con FleQ y FleN se obtuvieron mediante PCR. Los amplicones generados presentaban colas con dianas de restricción que, tras su digestión, dejaron un extremo 5' protuberante. Estos extremos se rellenaron mediante Klenow con una mezcla de nucleótidos que incluía α [32P]dCTP. Para ello se prepararon mezclas de reacción que contenían 1 μ g de sonda, tampón de reacción H (Roche), 0.25 mM de cada desoxinucleótido dGTP, dTTP y dATP, 10 μ Ci de α [32P]dCTP y 2 U de Klenow (Roche). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. El ADN marcado se purificó mediante el kit MSB Spin PCRapace (Invitex) y se eluyó en 100 μ L de agua para obtener una concentración final de la sonda de 10 ng/ μ L.

La actividad específica de las sondas se determinó mediante el conteo de 1 μ L del eluido en un contador de centelleo LS 6500 (Beckman coulter™).

3.5.2 Ensayo de retardo de movilidad en gel

Para los ensayos de retardo de movilidad en gel se siguió el protocolo empleado en (Baraquet & Harwood, 2016). Los ensayos de unión a ADN de FleQ y FleN se llevaron a cabo en tampón de unión (Tris-HCl 10 mM (pH 7.8), KCl 50 mM, acetato magnésico 8 mM, 50 ng/ μ L albúmina de suero bovino (BSA), glicerol 5 % (v/v)) con 100 ng de la sonda marcada, 200 ng de Poly(dIdC) como ADN competidor, 50 μ M ATP, 50 μ M di-GMPc cuando fue preciso y concentraciones crecientes de FleQ y FleN en tampón de conservación (Tris-HCl 20 mM (pH 8), KCl 250 mM, EDTA 0.1 mM, glicerol 50 % (v/v), DTT 2mM) en un volumen final de 10 μ L. Las mezclas de reacción se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo que la reacción se paró mediante la adición de 2 μ L de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.125 % (p/v), xylene cyanol 0.125 % (p/v), Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, glicerol 30 % (v/v)).

Las mezclas de reacción ADN-proteína fueron resueltas mediante electroforesis en gel nativo de acrilamida al 6 % (p/v) en tampón Tris-glicina EDTA a 4 °C. Los geles se secaron con un secador Hoefer™ Slab Gel Dryer CD 2000 (GE Healthcare) y se expusieron a una pantalla sensible a radiaciones gamma. Las bandas se visualizaron con un escáner Typhoon 9410. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo usando ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

Capítulo 1

Regulación de los genes de biofilm en *Pseudomonas putida* KT2442

1.1 Papel de FleN en la regulación del gen *lapA* y el operón *bcs*

El regulador transcripcional FleQ es un elemento fundamental en la activación de los promotores de genes flagelares dependientes del factor σ^{54} (capítulo 2). Sin embargo, en *P. putida*, los mutantes que carecen de esta proteína reguladora también son incapaces de adherirse a superficies y formar biofilms, a pesar de que la presencia de flagelo no es indispensable en el proceso (López-Sánchez *et al.*, 2016). Los principales responsables de la formación de biofilm en *P. putida* son la adhesina de superficie LapA y el complejo de la celulosa sintetasa codificado en el operón *bcs*, encargado de sintetizar celulosa (Klausen *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2011). Estudios previos realizados en nuestro grupo demostraron que FleQ regula positivamente la expresión de *lapA*, y negativamente la del operón *bcs* (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016). Dado el papel que juega FleN como proteína moduladora de la actividad de FleQ en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2000; Dasgupta & Ramphal, 2001), cabe preguntarse si FleN modifica los valores de expresión de estos promotores en *P. putida* KT2442.

Como primer paso para caracterizar los mecanismos reguladores que controlan la expresión de ambos genes, se determinó la expresión de los promotores *PlapA* y *Pbcs* en diferentes fondos mutantes de genes reguladores. Para ello, se transfirieron mediante conjugación triparental las fusiones transcripcionales *PlapA-gfp-lacZ* (pMRB67) y *Pbcs-gfp-lacZ* (pMRB112) a la estirpe silvestre KT2442 y a los mutantes de delección $\Delta fleQ$, $\Delta fleN$ y el doble mutante $\Delta fleQ \Delta fleN$, y se midió la expresión en fase estacionaria mediante ensayos de actividad β -galactosidasa (Fig. 12).

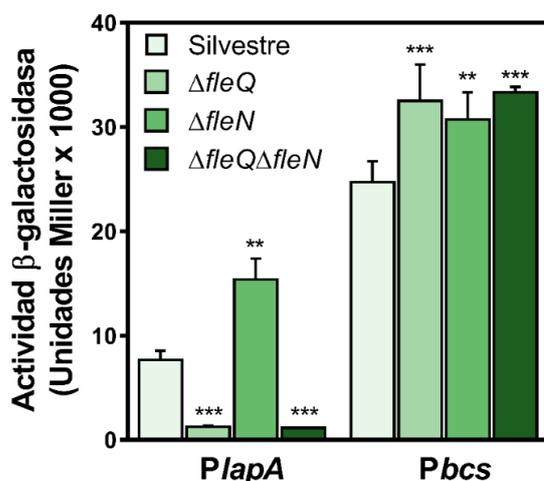


Figura 12. Expresión diferencial de los genes relacionados con biofilm en diferentes fondos mutantes. Actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a los promotores *PlapA* y *Pbcs* en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fleQ$, $\Delta fleN$ y $\Delta fleQ \Delta fleN$. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Como se observa en la figura 12 y de acuerdo con los resultados publicados previamente (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016), la expresión de *P_{lapA}* en el mutante $\Delta fleQ$ se redujo notablemente con respecto a la observada en la estirpe silvestre (6 veces), lo que indica activación de la transcripción desde *P_{lapA}* por FleQ. Por el contrario, los valores de expresión no solo no se redujeron, sino que incluso se duplicaron en el mutante $\Delta fleN$, indicando un efecto negativo de esta proteína sobre la expresión de *P_{lapA}*. El doble mutante $\Delta fleQ \Delta fleN$ mostró niveles bajos de expresión, muy similares a los que encontramos en $\Delta fleQ$, señalando que la falta de FleN no tiene efecto alguno sobre la expresión de *P_{lapA}* en ausencia de FleQ. Estos datos sugieren que el efecto represor de FleN sobre *P_{lapA}* se ejerce inhibiendo la función activadora de FleQ. Por el contrario, en el caso del promotor *P_{bcs}*, la expresión aumentó ligeramente, aunque de forma significativa (entre 1.3 y 1.4 veces), en todos los fondos mutantes estudiados, lo que indica que tanto FleN como FleQ parecen ser necesarias para reprimir débilmente la transcripción de este promotor. Atendiendo a los resultados obtenidos, FleQ activa la expresión en el caso de *P_{lapA}* mientras que FleN antagoniza su acción. Por su parte, en el promotor *P_{bcs}*, FleN no antagoniza la actividad de FleQ y ambas proteínas actúan regulando negativamente la transcripción.

1.2 Los niveles intracelulares de di-GMPc modulan la actividad de los reguladores FleQ y FleN sobre la expresión de los genes *lapA* y *bcs*

El aumento en los niveles de di-GMPc promueve, por normal general, la formación de biofilm en bacterias (Simm *et al.* 2004). En el caso de *P. aeruginosa*, el di-GMPc interacciona de forma directa con el dominio ATPasa AAA⁺ de FleQ modificando así su actividad (Baraquet & Harwood, 2013). La proteína reguladora FleN también interacciona con este dominio y se cree que modula de esta forma la respuesta de FleQ al segundo mensajero (Chanchal *et al.*, 2017). Para elucidar la posible respuesta de ambas proteínas reguladoras a los niveles de di-GMPc, se ensayó la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales a los promotores *P_{lapA}* y *P_{bcs}* en los mutantes carentes de los elementos reguladores a los que previamente se les habían transferido plásmidos que permiten la sobreexpresión de la fosfodiesterasa YhjH (pMRB89) y que, por tanto, disminuye los valores de di-GMPc intracelulares, o de la diguanilato ciclasa YedQ (pYedQ), que incrementa los niveles intracelulares del segundo mensajero (Fig. 13).

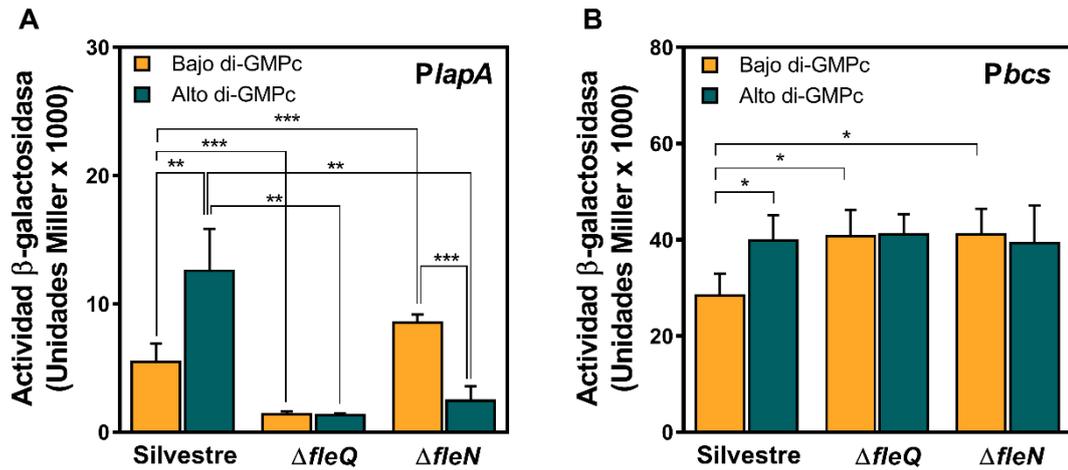


Figura 13. Efecto del di-GMPc sobre los elementos reguladores FleQ y FleN en promotores relacionados con el biofilm. Actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a los promotores *PlapA* (A) y *PbcS* (B) en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fleQ$ y $\Delta fleN$ en respuesta a altos y bajos niveles de di-GMPc intracelular. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia entre los gráficos agrupados. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La manipulación de los niveles de di-GMPc tuvo efectos dispares dependiendo del promotor y el fondo genético estudiado. En el caso del promotor *PlapA* (Fig. 13 A), la estirpe silvestre mostró niveles de expresión 2.3 veces superiores en condiciones de alto di-GMPc en comparación con los obtenidos a baja concentración, indicando una estimulación de la transcripción desde *PlapA* por di-GMPc. En ausencia del regulador FleQ, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes regímenes de di-GMPc estudiados, señalando que los niveles de di-GMPc no afectan a la expresión de este promotor en ausencia de FleQ. En este fondo mutante, los niveles de expresión del promotor se mantuvieron por debajo de los observados en la estirpe silvestre, independientemente de los niveles de di-GMPc, lo que confirma el papel de FleQ como activador transcripcional descrito en el apartado anterior. En el fondo mutante $\Delta fleN$, la expresión de *PlapA* fue 3.5 veces inferior en condiciones de alto di-GMPc respecto a los valores obtenidos en bajo di-GMPc, lo que supone una inversión del patrón de respuesta a di-GMPc descrito en la estirpe silvestre. La ausencia de FleN no impide que la expresión desde *PlapA* responda a cambios en los niveles de di-GMPc, lo que confirma que es FleQ, y no FleN, la proteína encargada de detectar estas variaciones. Sin embargo, la alteración del patrón de respuesta a di-GMPc indica que la sensibilidad de FleQ a los niveles de esta molécula depende de la proteína moduladora FleN. En conjunto, los resultados indican que cuando la concentración de di-GMPc es baja, FleN tiene un ligero efecto

antagonizando la acción de FleQ, mientras que a altas concentraciones ambas proteínas actúan sinérgicamente para activar *P_{lapA}*.

En el caso del promotor *P_{bcs}*, la expresión en la estirpe silvestre también fue superior en condiciones de alto di-GMPc, aunque en este caso la diferencia entre ambas condiciones no superó las 1.4 veces, lo que indica una ligera estimulación de la transcripción desde *P_{bcs}* por di-GMPc, más sutil que la observada en el caso de *P_{lapA}*. Por su parte, la expresión en el fondo mutante $\Delta fleQ$ se incrementó en condiciones de bajo di-GMPc a niveles equivalentes a los mostrados por la estirpe silvestre en alto di-GMPc, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión entre el mutante y la estirpe silvestre a altas concentraciones de di-GMPc. Por su parte, la delección de *fleN* produjo un efecto equivalente al observado tras deleccionar *fleQ*. Estos resultados sugieren que FleQ y FleN ejercen conjuntamente un efecto represor sobre el promotor *P_{bcs}*, que es suprimido cuando se produce un incremento en los niveles de di-GMPc.

Por tanto, la expresión de la adhesina LapA así como del complejo de la celulosa sintasa se estimulan cuando se incrementan los niveles de di-GMPc, lo que correlaciona con la superproducción de biofilm observada al sobreexpresar DGC en la estirpe silvestre (Matilla *et al.*, 2011). Sin embargo, el mecanismo por el que FleQ y FleN modulan la expresión de ambos promotores es distinto. En el promotor *P_{lapA}*, FleQ es el responsable de activar la expresión en respuesta al incremento de di-GMPc mientras que FleN modula la sensibilidad de FleQ a este. Sin embargo, la acción de FleQ y FleN sobre *P_{bcs}* es equivalente, ejerciendo ambos un efecto represor que es suprimido cuando aumentan los niveles de di-GMPc.

1.3 La proteína moduladora FleN y el di-GMPc determinan la interacción entre FleQ y los promotores *P_{lapA}* y *P_{bcs}*

Para profundizar en los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los promotores en estudio, se realizó un análisis de las secuencias de *P_{lapA}* y *P_{bcs}* con el objetivo de localizar aquellas secuencias con posible actividad promotora y posibles sitios implicados en la regulación de la expresión.

En la región promotora *P_{lapA}*, se incluyeron las seis secuencias -35 y -10 identificadas en esta región por Ainelo *et al.* (2017) tras el establecimiento de los sitios de inicio de la transcripción. En el caso de la región promotora *P_{bcs}*, se identificaron las secuencias -35 y -10 correspondientes a un posible promotor σ^{70} mediante un análisis *in silico* de la secuencia (Fig. 14). Los posibles sitios de unión de FleQ en cada una de las regiones promotoras fueron identificados mediante comparación con la secuencia

Capítulo 1

Para estudiar la interacción de FleQ-FleN con los posibles sitios de unión identificados en las regiones promotoras de *PlapA* y *Pbcs*, se superprodujeron las proteínas FleQ y FleN fusionadas a una cola de inteína en su extremo N-terminal, se purificaron mediante el sistema IMPACT™ y se realizaron ensayos de retardo de movilidad en gel. Como sondas se utilizaron fragmentos amplificados por PCR, cortados con enzimas de restricción y marcados mediante relleno de los extremos 3' con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa en presencia del nucleótido radiactivo α -³²P dCTP. En el caso de la región promotora de *Pbcs*, la sonda consistió en un fragmento de 552 pb que contenía la región comprendida desde la posición -571 hasta la posición -21 respecto al codón de inicio (sonda *Pbcs*). La región promotora *PlapA* fue dividida en 2 fragmentos: la sonda *PlapA_1* que abarca desde la posición -997 a la posición -494 y *PlapA_2* que se prolonga desde la posición -513 a la posición +2 respecto al codón de inicio. Atendiendo a la localización de los posibles sitios de unión de FleQ detectados tras el análisis de las regiones promotoras, en la sonda *Pbcs* y *PlapA_2* se localizarían dos posibles sitios de interacción con FleQ mientras que en la sonda *PlapA_1* encontraríamos un único sitio de unión. En la figura 15 A se representan las posiciones relativas que ocupan cada uno de los sitios de unión a FleQ en las sondas empleadas.

Para las reacciones de unión, se incorporaron las proteínas individualmente a concentraciones de 1 o 2 μ M, o de forma conjunta a concentraciones equimolares. Dada la actividad ATPasa descrita para ambas proteínas y su posible influencia sobre la formación de los complejos se adicionó ATP 50 μ M al tampón de reacción. Cuando se incorporó FleQ de forma individual no se observó un retardo detectable en ninguna de las sondas empleadas (carriles 3 y 5 en Fig. 15 B, C y D). Sin embargo, cuando FleQ y FleN fueron ensayados de forma conjunta se produjo un retardo en la movilidad de las 3 sondas estudiadas, apareciendo un complejo que incrementó su intensidad al aumentar la concentración de las proteínas (carriles 7 y 9 en Fig. 15 B, C y D), lo que sugiere que, en presencia de FleN, FleQ interacciona físicamente con ambas regiones promotoras. Teniendo en cuenta el efecto de las concentraciones de di-GMPc observado *in vivo*, se decidió estudiar el posible efecto de su adición sobre la unión del complejo FleQ-FleN a las regiones promotoras. La adición de di-GMPc por sí solo o junto a FleQ no alteró la movilidad de las sondas en el gel (carriles 2 y 4 en Fig. 15 B, C y D) mientras que se observó un claro efecto tras la adición de di-GMPc en las reacciones que contenían FleQ y FleN. En las sondas *PlapA_1* y *PlapA_2*, las bandas retardadas incrementaron su intensidad en presencia de di-GMPc (carriles 8 y 10 en Fig. 15 C y D). Por el contrario, la banda retardada que observamos en la sonda correspondiente al promotor *Pbcs* desapareció por completo tras la adición del di-GMPc (carriles 8 y 10 en Fig. 15). En

ambos casos, los resultados indican que el efecto del di-GMPc sobre la expresión de ambos promotores (Fig. 13) debe a que este es capaz de modificar la afinidad del complejo FleQ-FleN por las regiones promotoras estudiadas.

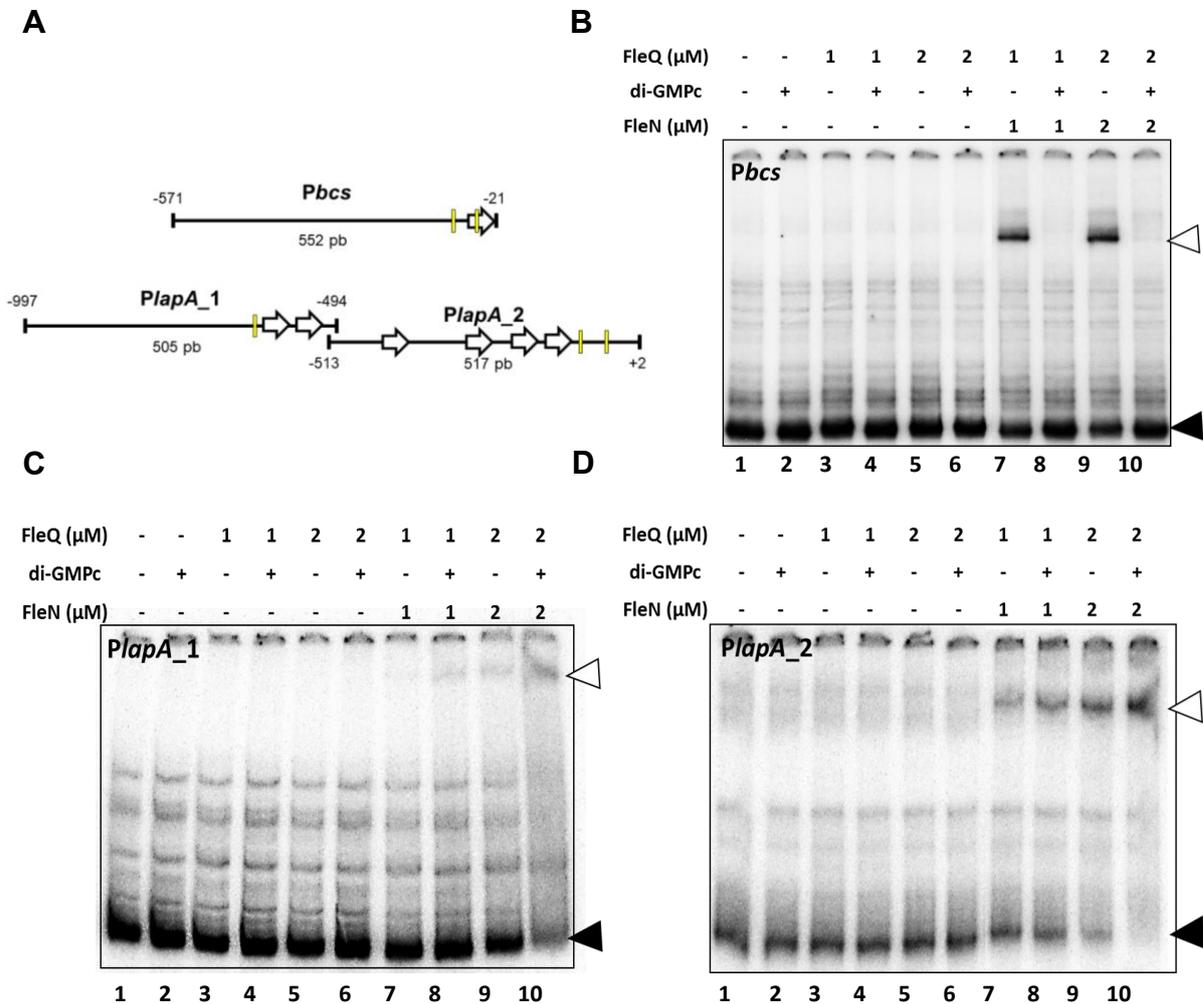


Figura 15. Unión de FleQ a los promotores de biofilm *PlapA* y *PbcS*. (A) Esquema de la localización de los posibles sitios de unión a FleQ y promotores en las sondas empleadas en los ensayos de retardo en gel. Los posibles sitios de unión a FleQ se representan con rectángulos amarillos y los promotores con flechas. Ensayo de retardo en gel de los fragmentos *PbcS* (B), *PlapA_1* (C) y *PlapA_2* (D). La numeración de 1 a 10 en la parte inferior hace referencia a los carriles del gel. Los signos (+) indican presencia y los signos (-) ausencia. Las concentraciones de FleQ y FleN empleadas se detallan en la cabecera de las gráficas. En los carriles que lo contienen, la concentración de di-GMPc empleada es 50 μM. Las puntas de flecha blanca indican el complejo retardado mientras que las negras indican la sonda libre (n=2).

Capítulo 1

En resumen, los resultados arrojados por los ensayos *in vitro* sugieren que (1) FleQ regula la transcripción de *lapA* y del operón *bcs* mediante la interacción directa con sus regiones promotoras, (2) FleQ presenta al menos 1 sitio de unión a la región promotora del operón *bcs* y al menos 2 a la región promotora de *lapA*, (3) la unión de FleQ al ADN únicamente se produce en presencia de FleN en las condiciones ensayadas y (4) el di-GMPc antagoniza la unión de FleQ o el complejo FleQ-FleN a *Pbcs* mientras que potencia su interacción con *PlapA*.

Capítulo 2

Regulación transcripcional de los genes flagelares en *Pseudomonas putida* KT2442

2.1 Análisis *in silico* del clúster flagelar en *P. putida* KT2442

En varias especies de *Pseudomonas*, entre las que se encuentra *P. putida*, los genes responsables de la síntesis del flagelo y su regulación se encuentran agrupados en una región concreta del genoma frecuentemente denominada clúster flagelar. En *P. putida*, la información acerca de la organización y funcionamiento de esta región es limitada y la regulación génica asociada al proceso de ensamblaje flagelar no ha sido estudiada en detalle hasta la fecha. Para abordar este problema experimental y determinar la localización de los promotores y la composición de los operones, se llevó a cabo un análisis *in silico* de los 62.5 Kb que comprenden el clúster flagelar en *P. putida*. Para la identificación de posibles promotores en las regiones intergénicas se emplearon datos experimentales disponibles en la literatura, resultados de experimentos previos realizados en nuestro grupo y el software de predicción de operones DOOR² (Mao *et al.*, 2009) (Fig. 16).

Empleando esta metodología se lograron identificar 23 promotores encargados de regular la expresión de 64 genes, 60 de los cuales pueden relacionarse directa o indirectamente con el ensamblaje y funcionamiento flagelar o con el sistema de quimiotaxis asociado al flagelo y 4 genes que codifican proteínas con función desconocida (*fliK2*, *flhB2*, *pp4379* y *pp4387*). De entre todos los genes que codifican proteínas estructurales, únicamente *motA* y *motB*, que codifican los estatores empleados en la movilidad tipo *swimming* (Khan *et al.*, 1988; Toutain *et al.*, 2005), se encuentran fuera de la agrupación génica flagelar, formando una única unidad transcripcional flanqueada por los genes *pp4906* y *rsgA*. Dentro del clúster flagelar, los genes que codifican proteínas implicadas en los mismos procesos o que forman parte de las mismas estructuras flagelares se encuentran frecuentemente formando parte del mismo operón, como se observa en los genes que codifican el sistema de secreción tipo 3 o los que se encargan del ensamblaje del filamento (Fig. 16). La agrupación de los genes también parece responder al lugar que ocupan en la secuencia de ensamblaje flagelar. Por ejemplo, es frecuente observar genes que codifican elementos de la barra y del anillo LP, o del sistema de secreción tipo 3 y del anillo C, cuya expresión debe ser simultánea, formando parte del mismo operón. Cabe suponer que esta organización génica permite a la bacteria regular de forma más precisa la expresión de grupos de genes que, al codificar la misma estructura, deben estar regulados de la misma forma. Sin embargo, la longitud de muchos de estos operones y la existencia de promotores internos, algunos de ellos previamente descritos en nuestro grupo, como el que controla la expresión del operón que incluye los

genes reguladores *flhF*, *fleN* y *fliA* (*PflhF*) (Navarrete *et al.*, 2019), sugiere a la existencia de mecanismos de regulación adicionales.

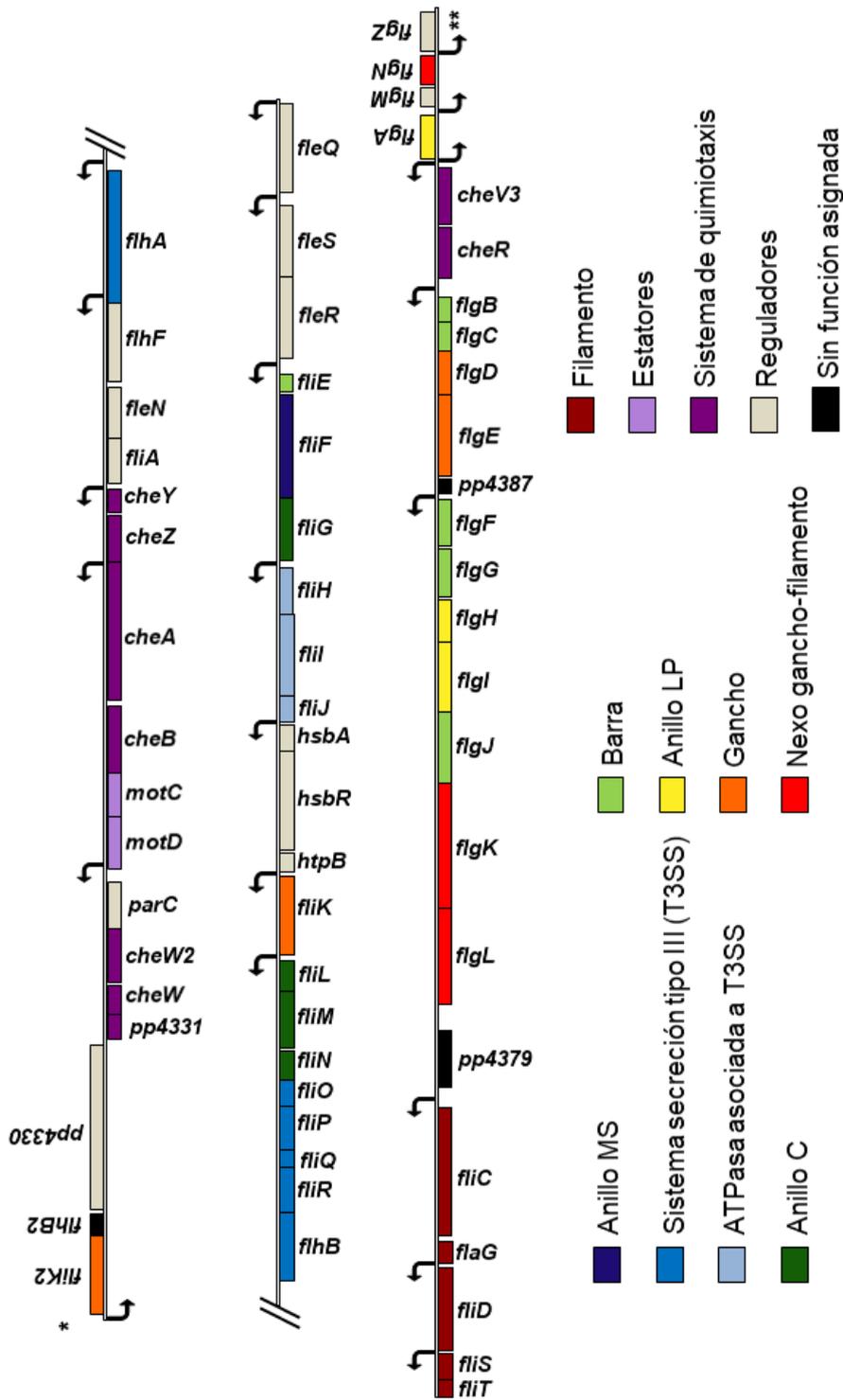


Figura 16. Organización del clúster flagelar en *P. putida* KT2442. Los genes anotados proceden de la base de datos de *Pseudomonas* Genome DB (Winsor *et al.*, 2016). Por homología con genes ya descritos en otras especies de *Pseudomonas*, muchos de ellos fueron renombrados para facilitar la comprensión. El inicio del grupo de genes flagelares se indica con (*) y corresponde con la posición 4.917.432 en el genoma de *P. putida* KT2440, (**) indica el final de la agrupación en la posición 4.988.330. La (//) representada en el esquema indica una discontinuidad de 8,4 Kb en el clúster flagelar. El código de colores hace referencia a la función que cumplen en el flagelo ensamblado

2.2 La expresión del regulador principal FleQ es independiente del resto de elementos reguladores de la cascada de activación transcripcional

Uno de los mecanismos de control más habituales en las cascadas de activación de genes flagelares es la regulación de los niveles de expresión del regulador principal. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en reguladores como FlhDC presente en enterobacterias o el activador VisNR de *Sinorhizobium meliloti* (Smith & Hoover, 2009), entre muchos otros. En *P. putida*, se desconoce si la expresión del regulador principal FleQ está sujeta a mecanismos de regulación similares. Por esta razón se estudió la influencia de elementos reguladores incluidos tanto dentro (FleQ, FleN y FleR) como fuera del clúster flagelar (AlgZ) en los niveles de expresión del promotor *PfleQ*. Para ello, se transfirió a la estirpe silvestre y a las estirpes mutantes $\Delta fleQ$, $\Delta fleR$, $\Delta fleN$ y $\Delta algZ$ la fusión transcripcional *PfleQ-gfp-lacZ*, y se midió su actividad β -galactosidasa para comprobar la actividad del promotor en fase estacionaria (Fig. 17)

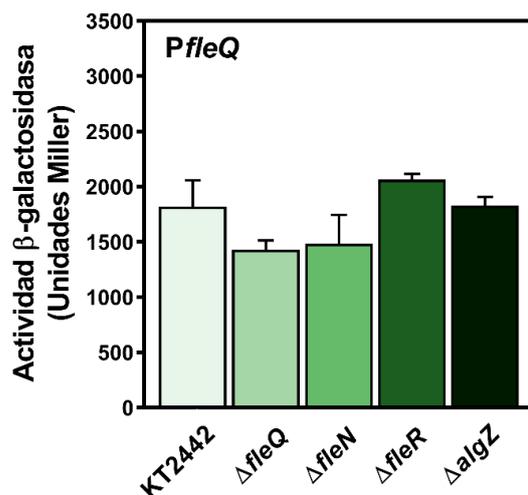


Figura 17. Expresión del promotor *PfleQ* en diferentes mutantes. Actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional *gfp-lacZ* al promotor *PfleQ* en los fondos genéticos mutantes $\Delta fleQ$, $\Delta fleN$, $\Delta fleR$ y $\Delta algZ$. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. No se detectaron diferencias significativas.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de *PfleQ* en ninguno de los fondos genéticos estudiados (Fig. 17). La semejanza en los niveles de expresión entre la estirpe silvestre y el fondo $\Delta fleQ$ indica que FleQ no modula su propia expresión. La expresión de *PfleQ* tampoco se vio modificada en el fondo mutante $\Delta fleN$, sugiriendo que los efectos de la delección de *fleN* sobre la expresión de los genes regulados por FleQ, como *lapA* o *bcs* (Fig. 12), no se deben a la alteración en los niveles de FleQ. Tampoco se observaron diferencias significativas de expresión en ausencia de los activadores transcripcionales FleR o AlgZ, sugiriendo que, de participar en la cascada de activación flagelar en *P. putida*, su papel se limitaría a etapas posteriores. Estos resultados ponen

de manifiesto que existen diferencias en los mecanismos que controlan las cascadas de activación de genes flagelares en sus primeras etapas.

2.3 El activador transcripcional FleQ y el factor σ^{54} son necesarios para la expresión de los genes relacionados con la formación de flagelo

En *P. putida*, los mutantes que carecen de FleQ o del factor σ^{54} (RpoN) son incapaces de sintetizar flagelos (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, se desconoce si el efecto de estas mutaciones se produce sobre la expresión del clúster flagelar en su conjunto o únicamente sobre la expresión de ciertos genes. Para comprobar la dependencia de los genes relacionados con el flagelo de ambos elementos reguladores, se transformó en la estirpe silvestre y los fondos genéticos $\Delta fleQ$ y $\Delta rpoN$ una librería de fusiones transcripcionales a *gfp-lacZ* de los 22 promotores relacionados con la síntesis de flagelo que controlan la expresión de todos los operones previamente descritos en el análisis *in silico* (Fig. 16). Como control negativo, se transformaron las mismas estirpes con el vector pMRB1, que no contiene ningún promotor. Se monitorizaron los valores de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (A_{600}) y de fluorescencia en el rango de la GFP de todas las fusiones transcripcionales en los diferentes fondos genéticos a intervalos periódicos de 15 minutos. Con estos datos se calculó la expresión relativa de cada promotor por unidad de tiempo en fase exponencial, también conocida como tasa de acumulación diferencial de GFP (Fig. 18).

La comparación de la tasa de acumulación en la estirpe silvestre y el fondo mutante $\Delta fleQ$ (Fig. 18) mostró diferencias significativas de expresión en los 22 promotores estudiados, siendo inferior en todos los casos en el mutante $\Delta fleQ$. Estos resultados confirman el papel de FleQ como regulador principal de la cascada flagelar, tal y como sugerían estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016). La expresión se vio reducida hasta niveles cercanos al plásmido control en los promotores de operones que contienen genes que codifican mayoritariamente elementos estructurales, como *PflgB* o *PflgF*. Por el contrario, los promotores de operones que codifican genes reguladores, como es el caso de *PflgM*, *PhsbA* o *PflhF*, mantuvieron niveles de expresión relativamente altos en el mutante $\Delta fleQ$. Estos altos niveles de expresión podrían responder a la presencia de promotores adicionales que no se encuentran necesariamente regulados por FleQ. Los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales en el fondo mutante $\Delta rpoN$, mostraron un comportamiento similar al descrito en ausencia de FleQ, observándose una reducción de la expresión en todos los promotores estudiados salvo en *PfliD*, donde no se aprecian diferencias significativas con

la estirpe silvestre. Los promotores *PflgM*, *PhsbA* y *PflhF* que muestran niveles de expresión altos en el mutante $\Delta fleQ$, los mantuvieron también elevados en el mutante que carece del factor σ^{54} , sugiriendo que estos promotores podrían estar parcialmente regulados por mecanismos ajenos a FleQ y RpoN. En conjunto, los datos indican que todos los promotores del clúster flagelar estudiados se encuentran regulados, directa o indirectamente, por el activador transcripcional FleQ y el factor sigma RpoN, a excepción de *PfliD* donde la delección de *rpoN* no tiene efecto sobre la expresión.

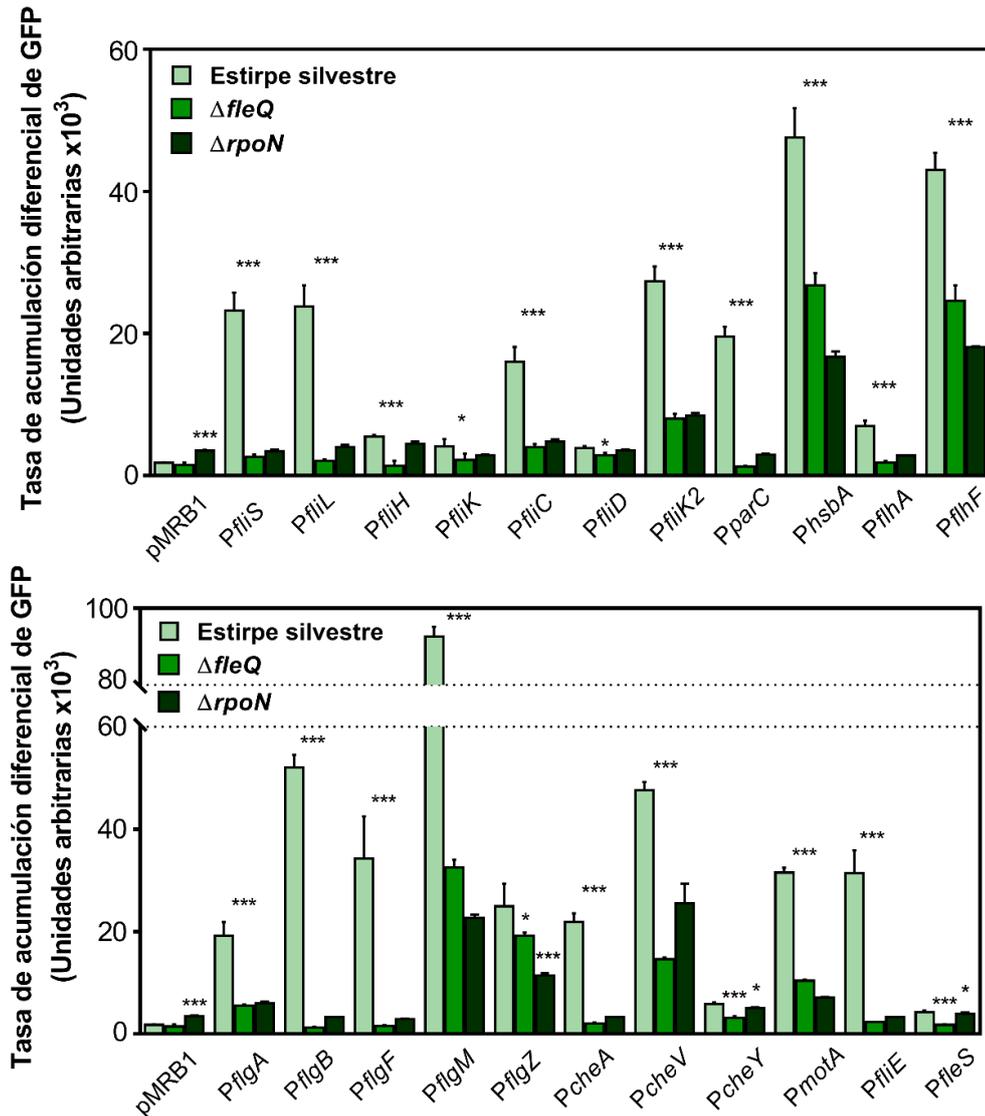


Figura 18. Efecto de las delecciones de FleQ y RpoN (σ^{54}) sobre la expresión de promotores relacionados con la síntesis de flagelo. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fleQ$ y $\Delta rpoN$. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.4 FleQ activa de forma directa la expresión de la mayoría de los promotores del clúster flagelar

Para estudiar qué promotores de genes flagelares se encuentran regulados de forma directa por FleQ se construyó un transposón que permite la expresión heteróloga de *fleQ* bajo el control de un promotor inducible por salicilato (pMRB178). La funcionalidad de la proteína FleQ expresada de forma ectópica se comprobó mediante la complementación del fenotipo de movilidad tipo *swimming* del mutante $\Delta fleQ$. La expresión de FleQ recuperó la capacidad de *swimming* del mutante $\Delta fleQ$ hasta niveles equivalentes a los de la estirpe silvestre (Fig. 19). La inducción del promotor mediante la adición de salicilato impidió por completo el crecimiento (datos no mostrados), lo que sugiere que la sobreexpresión de FleQ tiene efectos negativos sobre la viabilidad. Por esta razón, el uso de esta construcción se realizó siempre en ausencia del inductor.

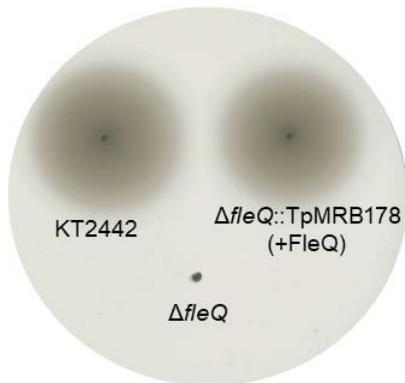


Figura 19. Complementación de la movilidad tipo *swimming* en el mutante $\Delta fleQ$. Ensayo de movilidad tipo *swimming* mediante picadura en agar semisólido de la estirpe silvestre, $\Delta fleQ$ y $\Delta fleQ::TpMRB178$. 16 h de incubación a 30 °C, sin inducción por salicilato (n ≥ 3).

El transposón que permite la expresión ectópica de FleQ contenido en la construcción pMRB178, así como el transposón usado como control contenido en pMRB172, se integraron en la estirpe $\Delta clusterflagelar$ o MRB130, que carece del clúster flagelar completo incluyendo los elementos reguladores (FleQ, FleN, FleSR, FliA y FlgM), a excepción de σ^{54} , que se localiza fuera. Mediante conjugación triparental se transfirió a ambas estirpes la librería completa de fusiones transcripcionales a promotores flagelares y se comprobó su actividad mediante un ensayo fluorimétrico de expresión. Los resultados se representan en la figura 20.

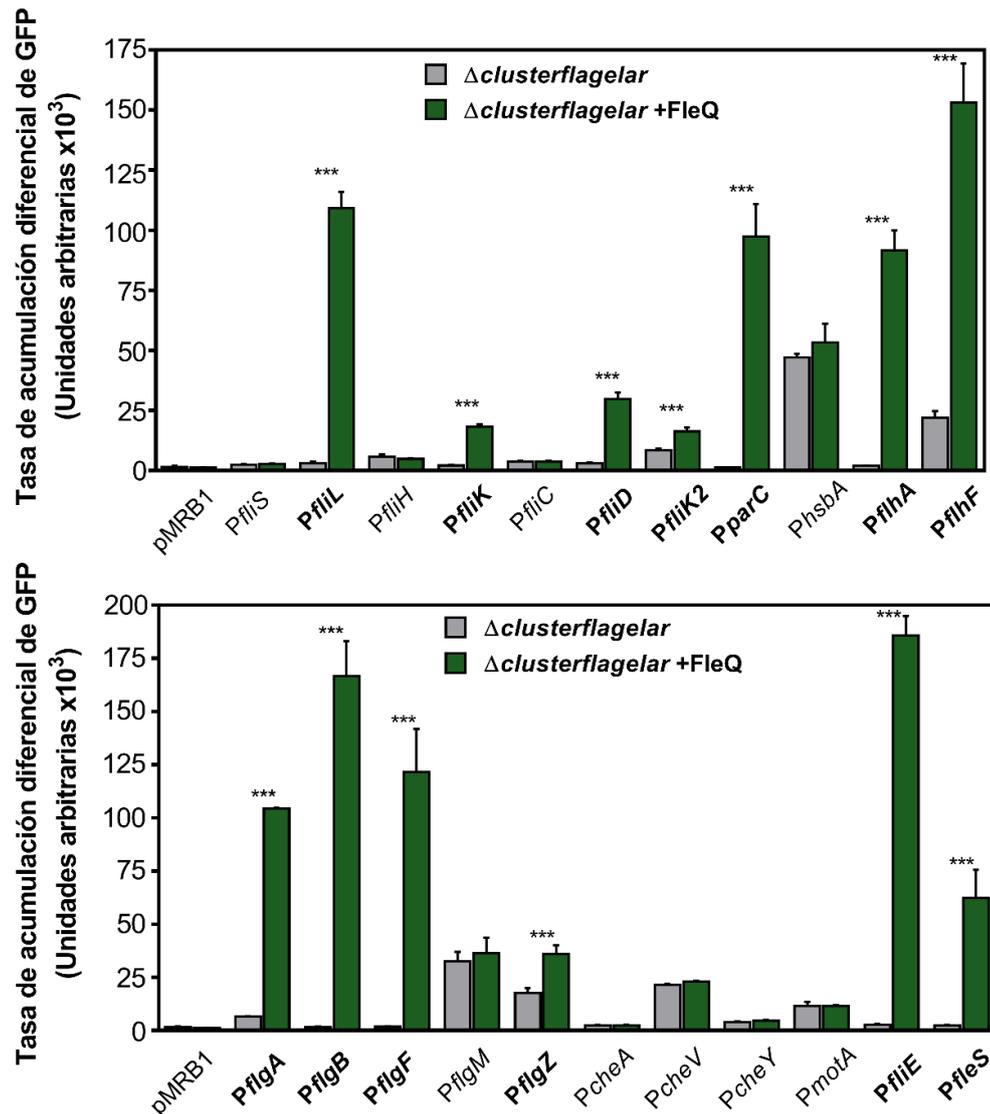


Figura 20. Efecto de la expresión ectópica de FleQ en el fondo mutante $\Delta clusterflagelar$. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe MRB130::TpMRB172 y MRB130::TpMRB178. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. En negrita se resaltan los promotores que muestran diferencias significativas en su expresión en presencia de FleQ.

La expresión ectópica de *fleQ* en el fondo genético MRB130, carente de otros elementos reguladores, aumentó la expresión de 13 de los 22 promotores que constituyen el clúster flagelar. En estos promotores la expresión se incrementó en más de 2 veces, salvo en el caso de *PfliK2*, indicando una gran dependencia de FleQ para activar la expresión. Entre los promotores directamente activados por FleQ encontramos a *PflgF*,

PflgB y *PfliK*, previamente descritos como de clase III o dependientes de FleS-FleR en la cascada de activación de *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003). Hasta la fecha, se asumía que la disminución en la expresión de estos genes en los mutantes *fleQ* se debía a la ausencia del sistema de dos componentes FleSR, cuya expresión también depende directamente de FleQ. Sin embargo, FleQ, en ausencia de FleSR, fue capaz de aumentar los niveles de expresión de estos promotores de forma considerable: 67 veces en el caso de *PflgF*, 110 veces en *PflgB* y 8,3 veces en *PfliK*. Por su parte, los promotores *PhsbA*, *PflgM* y *PflhF* mostraron niveles de expresión basal relativamente altos en el mutante $\Delta clusterflagelar$, confirmando que parte de su expresión está controlada por factores externos al clúster flagelar. La ausencia de activación directa por FleQ en los otros 9 promotores estudiados (*PfliS*, *PfliH*, *PfliC*, *PhsbA*, *PflgM*, *PcheA*, *PcheV*, *PcheY* y *PmotA*) sugiere que la dependencia de FleQ observada previamente (Fig. 18) es necesariamente resultado de un efecto indirecto.

2.5 FleN antagoniza la activación mediada por FleQ en la mayoría de los promotores que conforman el clúster flagelar

En *P. putida*, tal y como se describe en el capítulo 1 de este trabajo, FleN modula la expresión de los promotores relacionados con el biofilm y participa en la correcta detección de los niveles de di-GMPc por parte de FleQ. Sin embargo, la influencia de FleN sobre la expresión de los genes del clúster flagelar es aún desconocida. Para caracterizar esta regulación se transfirieron las fusiones transcripcionales de aquellos promotores flagelares directamente regulados por FleQ a la estirpe silvestre y al mutante $\Delta fleN$ y se midió la expresión a lo largo de la curva de crecimiento mediante un ensayo fluorimétrico de expresión (Fig. 21).

La delección de *fleN* provocó un aumento de la expresión de la mayoría de los genes flagelares que se encuentran regulados de forma directa por FleQ, sugiriendo que FleN antagoniza la activación que FleQ lleva a cabo sobre estos promotores. Las excepciones fueron *PfliK2*, donde la tendencia se invirtió ligeramente y *PflgZ*, donde no se apreciaron diferencias significativas. Precisamente, *PfliK2* y *PflgZ* son los promotores cuya expresión es menos dependiente de FleQ (Fig.20).

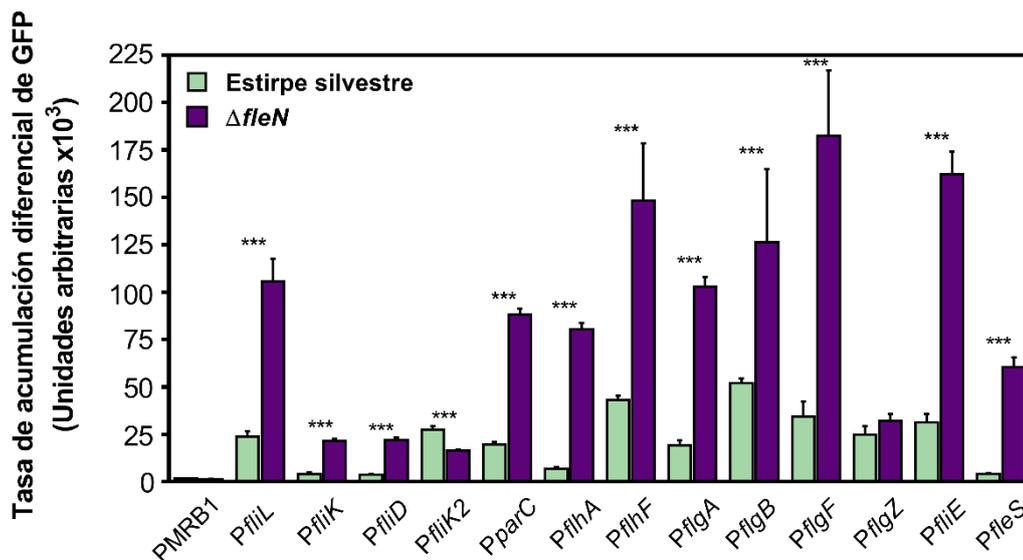


Figura 21. Efecto de la delección de *fleN* sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis del flagelo dependientes de FleQ. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe silvestre y en $\Delta fleN$. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.6 Los niveles de di-GMPc modifican la expresión de todos los promotores del clúster flagelar que son regulados de forma directa por FleQ

Comprobado el efecto que los niveles de di-GMPc intracelular tienen sobre la expresión de los promotores relacionados con la formación del biofilm (capítulo 1), cabe preguntarse si los niveles de este segundo mensajero también participan en la regulación del proceso antagónico de formación de flagelo. Para caracterizar esta respuesta, se estudió la expresión de las fusiones transcripcionales a *gfp-lacZ* de promotores relacionados con la síntesis flagelar y regulados de manera directa por FleQ en condiciones de alto y bajo di-GMPc. Para evitar la formación de los agregados celulares que se generan al incrementar los niveles de di-GMPc y que pueden interferir con las medidas recogidas por el fluorímetro, se empleó la estirpe MRB34, que presenta un transposón miniTn5-Km insertado en el gen *lapA*, que codifica la principal adhesina de superficie y que, en consecuencia, no forma estos agregados. Antes de transferir mediante conjugación triparental la colección de fusiones transcripcionales, se integró en este fondo mutante el transposón Tn7 contenido en el plásmido pMRB164, que expresa de forma inducible por salicilato la fosfodiesterasa YhjH procedente de *E. coli*, y que por

tanto disminuye los niveles de di-GMPc, o el contenido en pMRB165, que expresa la diguanilato ciclasa PleD de *C. crescentus* y que aumenta los niveles del segundo mensajero. Posteriormente, se calculó la tasa de acumulación diferencial de GFP en cada uno de los casos mediante un ensayo de fluorimetría. Los resultados se representan en la figura 22.

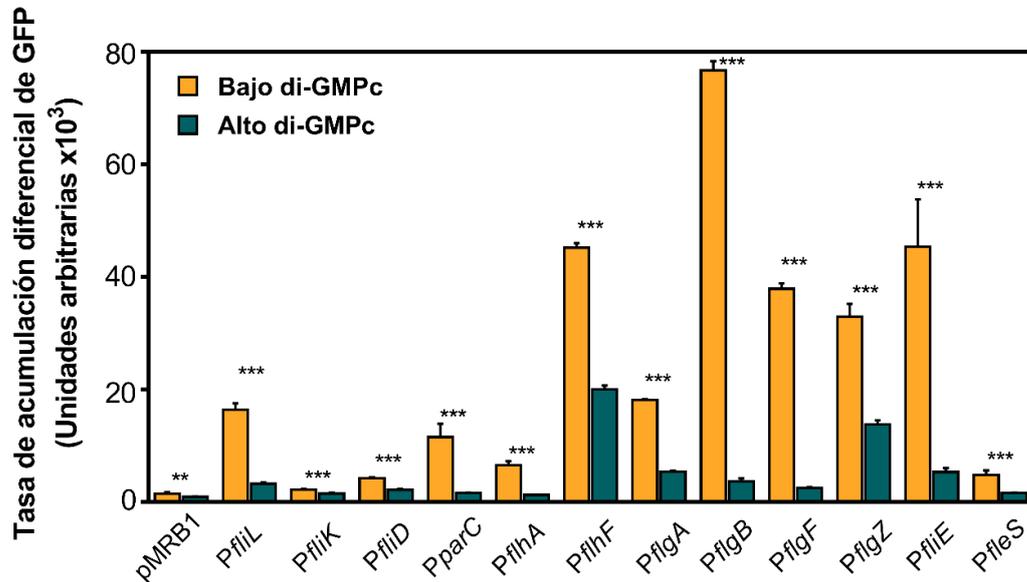


Figura 22. Efecto de la modificación de los niveles de di-GMPc intracelular sobre la expresión de los genes relacionados con flagelo dependientes de FleQ. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe MRB34::TpMRB164 y MRB34::TpMRB165. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Como se aprecia en la figura 22, la expresión de todos los promotores flagelares fue superior cuando los niveles de di-GMPc se mantuvieron bajos, lo que apoya el papel de este compuesto como interruptor molecular en la transición entre diferentes estilos de vida, descrito en diferentes especies (Ha & O'Toole, 2015). En el caso de *PfliK*, aunque la diferencia de expresión entre ambas condiciones es estadísticamente significativa (1.4 veces), no llegó a superar la leve variación observada en el plásmido control pMRB1 (1.5 veces), por lo que no se consideró como uno de los promotores sensibles a la concentración de di-GMPc. A pesar de que el di-GMPc tiene un efecto represor en la mayoría de los promotores estudiados, existen diferencias notables en la capacidad de represión dependiendo del promotor. Las variaciones en los niveles de di-GMPc intracelular tuvieron mayor efecto sobre la expresión de los operones constituidos

exclusivamente por genes estructurales. Concretamente, los promotores *PflgB*, *PflgF* y *PfliE* fueron los más afectados, con 20.5, 14.8 y 8.5 veces de cambio, respectivamente. Por su parte, los promotores *PflhF*, *PflgZ* y *PfleS*, que controlan operones constituidos únicamente por genes reguladores, mostraron diferencias de expresión de entre 2 y 3 veces en ambas condiciones.

2.7 El activador transcripcional FleR no es esencial para la activación de ninguno de los genes flagelares en *P. putida* KT2442

Una vez comprobado que el activador FleQ es capaz de activar de forma directa genes previamente descritos como dependientes del sistema de dos componentes FleS-FleR en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003), cabe preguntarse qué papel juega este regulador en la cascada de transcripción de genes flagelares en *P. putida* KT2442. Para caracterizarlo se construyó un mutante de delección en fase $\Delta fleR$ al que se transfirió mediante conjugación triparental la colección de fusiones transcripcionales a los promotores regulados de forma directa por FleQ identificados en el apartado 2.4. Los resultados representados en la figura 23 muestran la tasa de acumulación diferencial de GFP de las diferentes fusiones transcripcionales estudiadas.

La delección del regulador transcripcional FleR no provocó una reducción notable de la expresión en ninguno de los promotores flagelares estudiados. En la mayoría de los casos, la reducción no llegó a 2 veces de cambio con respecto a la expresión en la estirpe silvestre y no se observaron diferencias significativas de expresión en 4 de los promotores (*PfliK*, *PflgA*, *PflgZ* y *PfliE*). Los promotores cuya expresión se vio más afectada en ausencia de FleR fueron *PflgF*, *PflgB* y *PparC*, con 2.4, 2.3 y 2.1 veces de cambio respectivamente. Sin embargo, todos ellos mantuvieron niveles de expresión relativamente altos, superiores a los obtenidos en el mutante $\Delta fleQ$ en estas fusiones transcripcionales. Precisamente, 2 de los promotores en los que la delección de *fleR* tuvo mayor efecto (*PflgF* y *PflgB*), son aquellos descritos como dependientes de FleR en la cascada de *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003), indicando que la dependencia de FleR para la activación de estos promotores existe, aunque es solo parcial en *P. putida* KT2442. El tercero de los promotores identificados como dependientes de FleR en *P. aeruginosa* es *PfliK*, sin embargo, no se detectó un cambio estadísticamente significativo de la expresión en este caso.

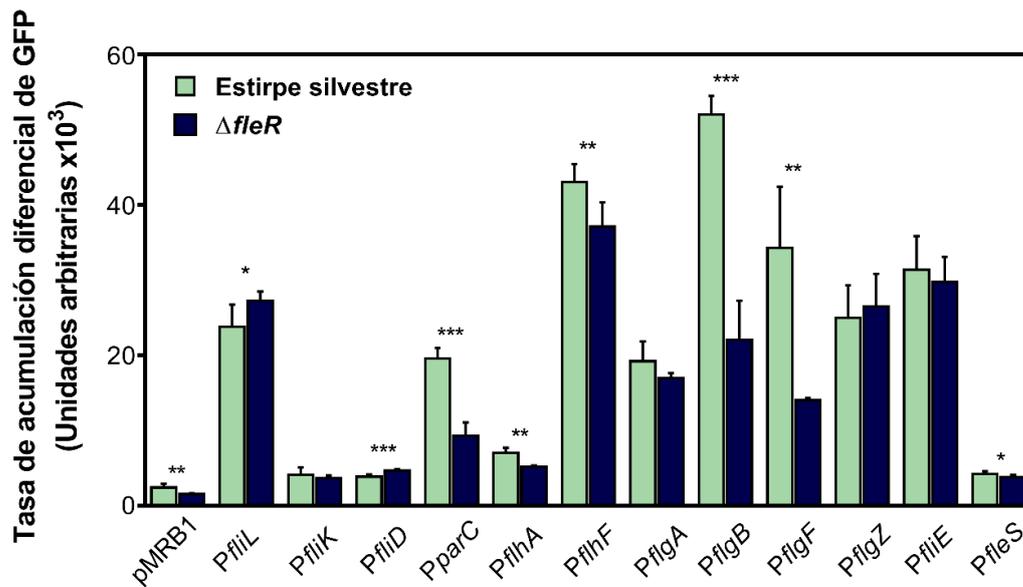


Figura 23. Efecto de la delección de *fleR* sobre la expresión de los genes relacionados con la formación del flagelo dependientes de FleQ. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe MRB34::TpMRB164 y MRB34::TpMRB165. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.8 FleR no es necesario para una correcta movilidad tipo *swimming* en *P. putida* KT2442

El escaso efecto de la delección de *fleR* sobre la expresión de los genes flagelares pone en cuestión si la presencia de este regulador es necesaria para el ensamblaje o si por el contrario participa en un ajuste preciso de la expresión requerido en determinadas circunstancias. Para determinar si el mutante es capaz de ensamblar y hacer funcionar el sistema flagelar con normalidad, se llevó a cabo un ensayo de movilidad tipo *swimming* en medio semisólido utilizando el mutante $\Delta fleR$. Como controles se emplearon la estirpe silvestre KT2442 y el mutante no móvil $\Delta fleQ$ (Fig. 24).

Los ensayos realizados mostraron que no existen diferencias apreciables en la capacidad para desplazarse en medio semisólido entre la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fleR$. Estos resultados confirman que el activador transcripcional FleR no es necesario para el ensamblaje y funcionamiento de sistema flagelar ni de quimiotaxis en las condiciones ensayadas, y pone de manifiesto diferencias significativas con *P. aeruginosa*, donde el mutante equivalente es no móvil (Ritchings *et al.*, 1995).

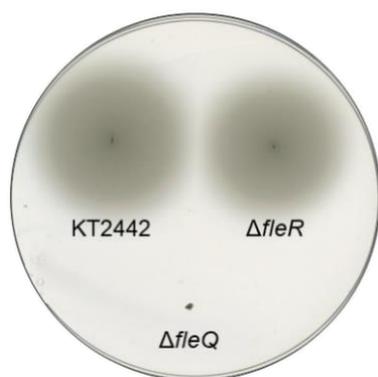


Figura 24. Fenotipo de movilidad tipo *swimming* del mutante $\Delta fleR$. Ensayo de movilidad tipo *swimming* mediante picadura en agar semisólido de la estirpe silvestre, $\Delta fleQ$ y $\Delta fleR$. 16 h de incubación a 30 °C, sin inducción por salicilato (n=3).

2.9 El factor de transcripción FliA es necesario para la expresión de los genes tardíos de la cascada flagelar

Existen 9 promotores relacionados con movilidad flagelar cuya expresión no depende de forma directa de FleQ (Fig. 20). Dado que el factor sigma FliA es necesario para la síntesis flagelar en *P. putida* (Rodríguez-Herva *et al.*, 2010), se optó por comprobar su influencia en la expresión del conjunto de promotores del clúster flagelar. Para ello se usó una aproximación similar a la empleada para FleQ. Se empleó la estirpe $\Delta clusterflagelar$ (MRB130) para integrar el transposón Tn7 contenido en pMRB286, que expresa FliA de forma heteróloga bajo el control de un promotor inducible por salicilato. De forma similar, se integró el transposón control contenido en el plásmido pMRB172. La colección de fusiones transcripcionales de los promotores flagelares fusionados a *gfp-lacZ* se transfirió a ambas estirpes mediante conjugación triparental, y se midió su expresión mediante un ensayo de fluorimetría (Fig. 25).

La expresión heteróloga de FliA provocó un aumento significativo en la expresión de 12 promotores flagelares. 7 de ellos mostraron un incremento de expresión de más de 5 veces en presencia de FliA y no habían sido previamente identificados como dependientes de FleQ (Fig. 20). Estos promotores incluyen aquellos que dirigen la expresión de genes que codifican elementos estructurales ligados al filamento (*PfliS*, *PfliC*), reguladores de las etapas tardías (*PflgM*), elementos del sistema de quimiotaxis (*PcheA*, *PcheV* y *PmotA*) o los estatores (*PmotA*). Estos resultados respaldan el papel de FliA como elemento fundamental durante las últimas etapas del ensamblaje flagelar. El promotor *PfliK2*, previamente identificado como regulado por FleQ (1,9 veces de cambio), mostró un aumento de expresión de 7,4 veces en presencia de FliA. Los 4 promotores restantes que aumentaron su actividad en presencia de FliA (*PfliL*, *PflgZ*, *PfliE* y *PflhF*) lo hicieron menos de 2,2 veces, y en todos los casos mostraron un incremento de expresión mayor tras la expresión ectópica de FleQ (Fig. 20). Por este motivo, los promotores *PfliL*,

PflgZ, *PfliE* y *PfliH* se clasificaron como promotores regulados por FleQ, mientras que el promotor *PfliK2* se incluyó dentro del grupo de promotores dependientes de FliA (Tabla 04). No es posible descartar que parte o la totalidad de estos promotores se encuentren regulados de forma conjunta por FleQ y FliA, aunque, teniendo en cuenta que la mayor parte de la expresión depende de uno de los reguladores, este fenómeno no sería muy relevante en la cascada de activación.

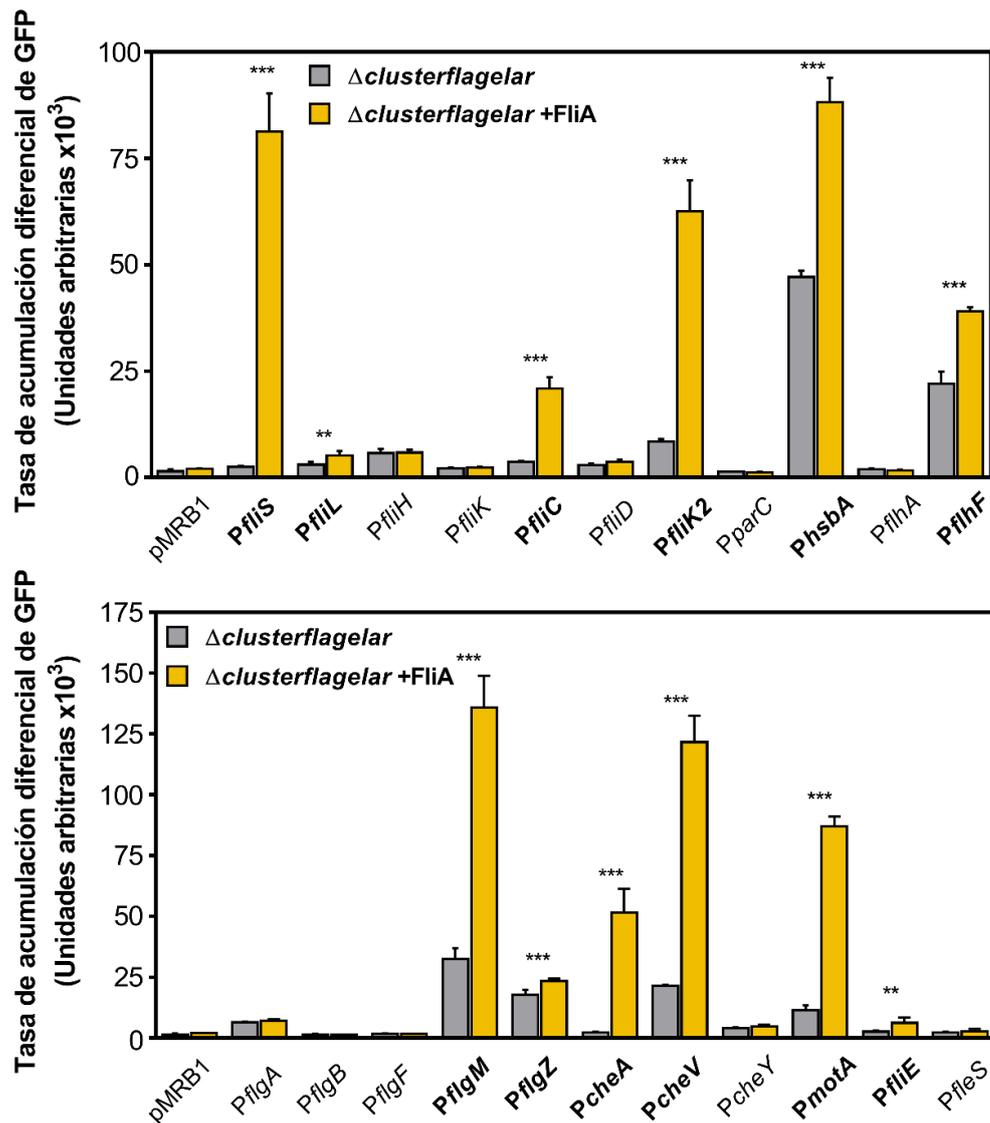


Figura 25. Efecto de la expresión ectópica de FliA en el fondo mutante $\Delta clusterflagelar$. Tasa de acumulación diferencial de GFP calculada a partir de los valores de fluorescencia de las fusiones transcripcionales *gfp-lacZ* a promotores de genes flagelares normalizados con respecto a la A_{600} durante la fase exponencial de crecimiento en la estirpe MRB130::TpMRB172 y MRB130::TpMRB286. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia entre gráficos agrupados. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Se resaltan en negrita las fusiones transcripcionales que muestran diferencias significativas en su expresión en respuesta a FliA

Tal y como se detalla en la tabla 04, todos los promotores del clúster flagelar, excepto *PfliH* y *PcheY*, se encuentran regulados por FleQ o FliA de manera directa. La expresión de *PfliH* y *PcheY* no se modificó de forma significativa tras la expresión heteróloga de ninguno de los reguladores. La baja expresión que presentan estos promotores en la estirpe silvestre y el ligero descenso de la expresión que se observa en el mutante $\Delta clusterflagelar$ podría indicar que las regiones amplificadas y fusionadas a *gfp-lacZ* no contienen ningún promotor y que, por tanto, la expresión de estos genes depende de promotores situados aguas arriba (demostrado para el caso del promotor *PcheY* en Navarrete *et al.* 2019), o bien que se trata de promotores débiles regulados por elementos externos al clúster flagelar.

Promotor	Veces de cambio en presencia de FleQ	Veces de cambio en presencia de FliA
pMRB1	0,9	1,4
PfliS	1,1	32,8
PfliL	36,2	1,7
PfliH	0,9	1
PfliK	8,3	1
PfliC	1	5,7
PfliD	10,1	1,2
PfliK2	1,9	7,4
PparC	70,7	0,9
PhsbA	1,1	1,9
PflhA	48,3	0,9
PflhF	7	1,8
PflgA	16	1,1
PflgB	110	0,8
PflgF	67,3	0,9
PflgM	1,1	4,2
PflgZ	2	1,3
PcheA	1,1	23,1
PcheV	1,1	5,7
PcheY	1,1	1,2
PmotA	1	7,5
PfliE	73	2,2
PfleS	27,6	1,2

Tabla 04. Efecto de la expresión ectópica de FleQ o FliA en el fondo mutante $\Delta clusterflagelar$ sobre la actividad de los promotores del clúster flagelar. Se muestran las veces de cambio en la expresión de los promotores en las estirpes $\Delta clusterflagelar$ TpMRBB178 (+FleQ) / TpMRB286 (+FliA) con respecto a la estirpe $\Delta clusterflagelar$ TpMRB172 (control). Calculado a partir de valores promedios ($n \geq 3$).

2.10 El análisis *in silico* de las regiones promotoras apoya los resultados experimentales

Para reforzar los resultados obtenidos experimentalmente, se analizaron las diferentes regiones promotoras en busca de posibles secuencias reconocidas por los factores σ^{70} , σ^{54} y FliA. Para ello, se alinearon mediante MUSCLE (Edgar, 2004) las 23 regiones promotoras previamente estudiadas (incluyendo *PfleQ*) en 6 especies de *Pseudomonas* ambientales y se emplearon las secuencias consenso de cada uno de estos factores descritas en la bibliografía para identificar sitios relevantes. El resultado de todos los alineamientos se muestra en detalle en el anexo II. En el conjunto de promotores, se lograron identificar 8 posibles secuencias reconocidas por FliA, 13 posibles secuencias reconocidas por σ^{54} y 3 posibles sitios -35 y -10 reconocidos por el factor σ^{70} . Todos los promotores estudiados presentaron secuencias reconocidas por un solo tipo de factor σ , de manera que no se identificaron sitios reconocidos por diferentes factores de transcripción en una misma región promotora. Aunque no es posible descartar la presencia de sitios no identificados, los resultados sugieren que cada una de las regiones promotoras del clúster flagelar se encuentra regulada en exclusiva por un único factor σ .

Entre las regiones promotoras que presentan posibles sitios reconocidos por FliA se encuentran las 7 previamente documentadas mediante ensayos fluorimétricos como claramente dependientes de FliA (más de 5 veces de cambio en presencia de FliA) (Fig. 25), lo que fortalece la validez de la aproximación experimental empleada. En el caso de los promotores *PfliL*, *PflhF* y *PflgZ*, identificados como dependientes de FleQ pero cuya expresión también aumenta ligeramente en presencia de FliA, no se identificaron secuencias reconocidas por FliA. Por su parte, en el promotor *PhsbA*, cuya expresión aumenta 1.9 veces en presencia de FliA, únicamente se localizaron las secuencias -35 y -10 reconocidas por el factor σ^{70} , resultado coherente con los altos niveles de expresión observados en esta fusión transcripcional en ausencia del resto de reguladores (fondo genético *Δ clusterflagelar*), aunque no explicaría el ligero incremento de expresión observado al producir FliA. El último de los sitios FliA identificados *in silico* se encuentra en el promotor *PcheY* que, sin embargo, no aparece regulado de forma directa por FliA (Fig. 25) y muestra niveles de expresión bajos en todos los fondos genéticos ensayados, por lo que es posible que la secuencia identificada *in silico* no se corresponda con un sitio reconocido por FliA.

Todos los promotores activados de forma directa por el activador transcripcional FleQ y cuya expresión se ve reducida en el fondo mutante *Δ rpoN* (Fig. 18) presentan

posibles sitios de unión de σ^{54} en su secuencia, resultado que apoya la hipótesis de que la activación transcripcional mediada por FleQ en los promotores del clúster flagelar también requiere de la presencia del factor σ^{54} . El promotor *PfliH* que, al igual que *PcheY*, no está regulado por FleQ ni por FliA, presenta un posible sitio reconocido por el factor σ^{54} . Sin embargo, esta secuencia únicamente se identifica en las 2 especies de *P. putida* empleadas en el alineamiento y no aparece en otras especies (ver anexo II), donde *fliH* parece estar englobado dentro del operón transcrito a partir de *PfliE*. La nula conservación interespecífica, así como los bajos niveles de expresión de este promotor en todos los fondos genéticos estudiados sugieren que este fragmento tampoco presenta actividad promotora en *P. putida* KT2442.

Por su parte, el análisis del promotor *PfleQ* permitió identificar 2 posibles sitios, parcialmente solapados entre sí, que cumplen el consenso para los sitios de unión del factor σ^{70} . Estos datos concuerdan con los obtenidos mediante ensayos β -galactosidasa (Fig. 17) donde se confirma que la regulación de este promotor es independiente de otros reguladores, tales como FleR o el propio FleQ, que habitualmente activan promotores dependientes de σ^{54} (Dasgupta *et al.*, 2003; Jyot *et al.*, 2002).

Finalmente, el análisis del alineamiento permitió identificar secuencias promotoras localizadas dentro de regiones codificantes, confirmando la presencia de promotores internos como ocurre en *PparC* o *PflhF*, ambos localizados en la secuencia codificante del gen inmediatamente aguas arriba.

2.11 Análisis de delección del promotor *PflgB* en *P. putida* KT2442

Los mecanismos moleculares que permiten a los activadores transcripcionales llevar a cabo la transcripción de promotores dependientes del factor σ^{54} han sido ampliamente caracterizados en activadores como NtrC o PspF (Jovanovic *et al.*, 1996; Wyman *et al.*, 1997). Sin embargo, la información a este respecto es mucho más limitada en FleQ y prácticamente inexistente en el caso de *P. putida*, donde los estudios acerca de la interacción de FleQ con regiones promotoras de genes dependientes de σ^{54} son muy escasos. Hasta la fecha, las secuencias consenso de unión de FleQ al ADN descritas provienen principalmente de los estudios de interacción entre FleQ y regiones promotoras de genes relacionados con la formación del biofilm, cuya expresión no es dependiente de σ^{54} (Baraquet & Harwood, 2016). Por este motivo, su utilidad a la hora de identificar sitios de interacción en regiones promotoras de genes flagelares es muy limitada y, a menudo, arroja resultados negativos. Para conocer en profundidad cómo ocurre la interacción entre FleQ y las regiones promotoras de genes dependientes de σ^{54} se llevó a cabo un estudio

pormenorizado del promotor *PflgB*. Este promotor regula la expresión del operón constituido por los genes *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE* y *pp4378*, que codifican los componentes de parte de la barra y el gancho del flagelo durante las etapas intermedias del ensamblaje. La expresión de *flgB* muestra una fuerte dependencia de FleQ en *P. putida* KT2442 (hasta 110 veces de cambio en presencia de FleQ, tabla 04). Sin embargo, esta regulación no se conserva en *P. aeruginosa*, donde es el regulador FleR el encargado de activar su expresión (Dasgupta *et al.*, 2003). Estas características lo convierten en un candidato idóneo para el estudio de las interacciones entre FleQ y promotores dependientes de σ^{54} .

Durante el análisis de la secuencia del promotor *PflgB* se identificaron posibles secuencias -12 y -24 correspondientes a un promotor σ^{54} . Para acotar las regiones determinantes en la activación de la expresión, se optó por realizar un análisis de delección de la región promotora. Para ello, se amplificaron mediante PCR 6 fragmentos de diferente longitud comprendidos entre las posiciones -449 y +128 con respecto al codón de inicio del gen *flgB*, y se clonaron por medio del sistema Gateway en el plásmido pMRB3, que incorpora los genes *gfp-lacZ* aguas abajo de la región clonada, generando las fusiones transcripcionales correspondientes. Los diferentes fragmentos ensayados se nombraron como $\Delta 1$ a $\Delta 5$ y se representan esquemáticamente en la figura 26 A.

Los fragmentos $\Delta 1$, $\Delta 2$ y $\Delta 3$ presentan delecciones parciales de diferente longitud aguas arriba del posible promotor determinado *in silico*, el fragmento $\Delta 4$ elimina también las regiones -12 y -24 del promotor σ^{54} , mientras que la delección $\Delta 5$ no contiene el fragmento inmediatamente aguas abajo del promotor (Fig. 26 A). Todas estas construcciones, junto con la que contiene el fragmento completo sin modificar (*PflgB*), fusionadas a *gfp-lacZ*, se transfirieron mediante conjugación triparental a la estirpe silvestre y a la estirpe mutante $\Delta fleQ$, midiéndose posteriormente su expresión mediante un ensayo de actividad β -galactosidasa (Fig. 26 B y C).

La diferencia en los niveles de expresión observada en la estirpe silvestre (Fig. 26 B) entre el promotor completo *PflgB* y la primera delección $\Delta 1$, que carece de los primeros 187 pb de la secuencia, aunque estadísticamente significativa, fue de apenas 1.3 veces. Estos resultados sugieren que no existen secuencias determinantes para la activación del promotor en esta región (entre las posiciones -449 y -263). En el caso de las delecciones $\Delta 2$ y $\Delta 3$, el efecto sobre la activación del promotor fue evidente, reduciéndose la expresión respecto al promotor silvestre 4.5 y 17.8 veces, respectivamente. Esta notable reducción sugiere la presencia de secuencias esenciales para la activación del promotor, tanto en el fragmento que comprende desde la delección $\Delta 1$ a $\Delta 2$ (posiciones -263 a -163), como en la secuencia que va desde $\Delta 2$ a $\Delta 3$ (posiciones -163 a -68).

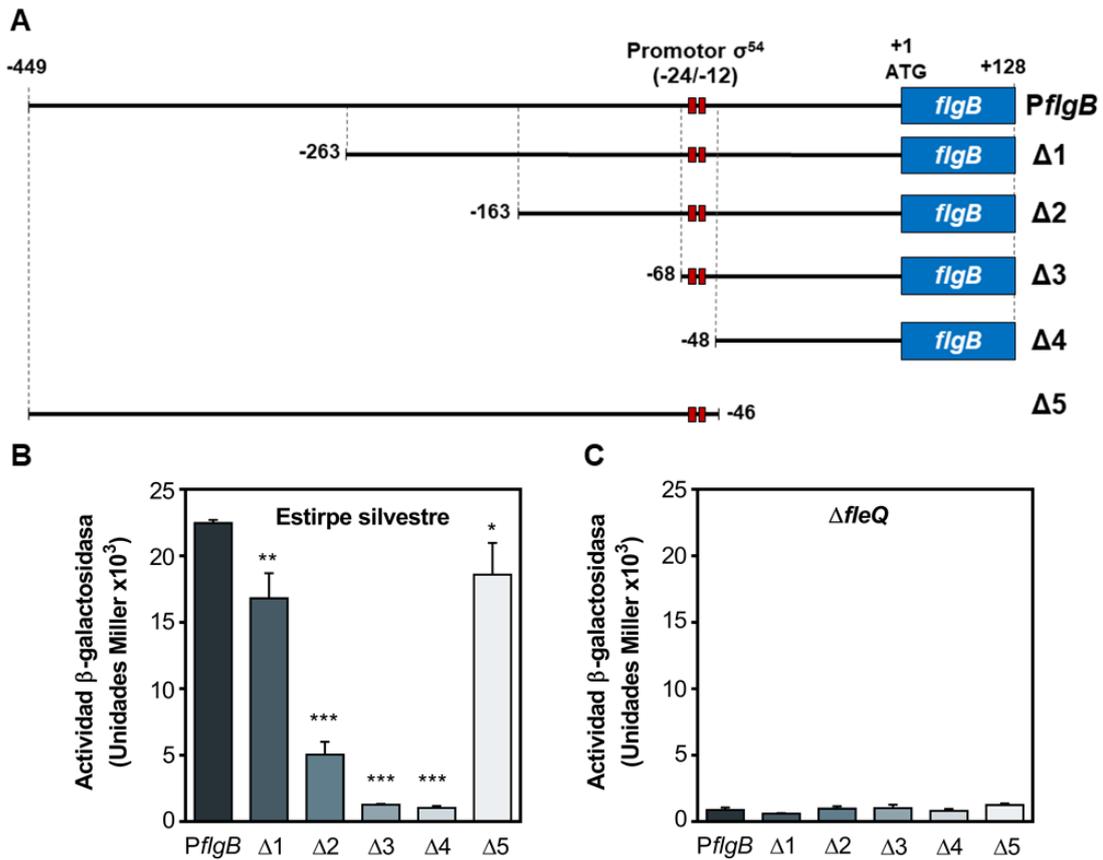


Figura 26. Análisis de delección del promotor *PflgB*. (A) Representación esquemática de los diferentes fragmentos ensayados. Se muestran las secuencias -24 y -12 del promotor identificado *in silico*. Los números indican las posiciones de inicio y fin de cada fragmento con respecto al codón de inicio del gen *flgB*. (B y C) Actividad β -galactosidasa del promotor *PflgB-gfp-lacZ* y las delecciones parciales $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$ y $\Delta 5$ en la estirpe silvestre (B) y $\Delta fleQ$ (C) durante fase estacionaria. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la región promotora intacta *PflgB*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

De todos los fragmentos que conservan el promotor σ^{54} propuesto, el fragmento $\Delta 3$ presentó los niveles de expresión más reducidos, con valores muy similares a los obtenidos en el mutante $\Delta fleQ$ para este mismo fragmento, lo que indica que todos los elementos que juegan un papel relevante en la activación del promotor se encuentran aguas arriba del punto de inicio del fragmento $\Delta 3$ (aguas arriba de la posición -68). La delección $\Delta 4$ elimina 20 pb adicionales que incluyen las secuencias -12 y -24 del promotor σ^{54} identificadas *in silico*, sin embargo, no se observó una disminución significativa de la expresión con respecto al fragmento $\Delta 3$, que sí las presenta. Estos resultados podrían indicar que la secuencia identificada *in silico* no se corresponde con el promotor, o bien que su actividad es totalmente dependiente de la presencia de sitios de activación, de forma que, una vez despojado de ellos, la actividad del promotor es mínima. Estos

resultados son coherentes con lo descrito en otros promotores σ^{54} , donde el concurso de proteínas activadoras es indispensable para iniciar la transcripción (Merrick, 1993). Finalmente, como se deduce de los resultados obtenidos al ensayar el fragmento $\Delta 5$, la eliminación de los 174 pb que se encuentran inmediatamente aguas abajo del promotor σ^{54} propuesto no tuvieron un efecto considerable sobre la expresión (apenas 1.2 veces de reducción con respecto al promotor silvestre), lo que confirma que todos los sitios de activación se encuentran aguas arriba del promotor, a diferencia de lo descrito en otros promotores dependientes de FleQ como *P_{lapA}* (capítulo 1) donde 2 de los sitios de interacción con FleQ se localizan aguas abajo de todos los promotores identificados en la región.

En el mutante carente de *fleQ* (Fig. 26 B), los niveles de expresión fueron bajos y no se detectaron diferencias significativas entre la expresión del promotor completo y las diferentes deleciones, sugiriendo que las diferencias de expresión observadas en la estirpe silvestre son debidas a la activación del promotor mediada por FleQ.

2.12 El promotor *P_{fliG}* presenta regiones reguladoras conservadas en diferentes especies de *Pseudomonas* ambientales

El análisis de deleción de la región promotora reveló que todos los sitios relevantes para la activación se localizan aguas arriba de la posición -68 con respecto al codón de inicio del gen *fliG* (Fig. 26, $\Delta 3$). Con la intención de detectarlos, se realizó un análisis comparativo en 6 de las especies de *Pseudomonas* ambientales más estudiadas mediante un alineamiento múltiple (CLUSTAL) (Thompson *et al.*, 1994) de las regiones promotoras *P_{fliG}* de *P. putida* KT2440 (*PpuKT2440*), *P. putida* F1 (*PpuF1*), *P. syringae* pv. tomato DC3000 (*PsyDC3000*), *P. syringae* pv. *syringae* (*Psysyrin*), *P. fluorescens* SBW25 (*PfISBW25*) y *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psavasta*), y se localizaron las regiones conservadas, que se muestran en la figura 28.

El alineamiento y análisis de las secuencias mostró un alto grado de conservación en diversas regiones del promotor localizadas entre las posiciones -263 ($\Delta 1$) y -68 ($\Delta 3$) con respecto al codón de inicio, descrita como la zona más influyente para la expresión de acuerdo con el análisis de deleción realizado previamente. Dada su localización en la región promotora y la ligera homología de secuencia detectada entre algunas de estas regiones y la secuencia consenso de unión de FleQ descrita en *P. aeruginosa* (Baraquet & Harwood, 2016), los sitios relevantes fueron denominadas como posibles sitios FleQ-1, 2, 3 y 4, según su posición en la región promotora. En las dos estirpes de *P. putida* analizadas, a diferencia del resto, los 4 posibles sitios de unión de FleQ son muy similares

entre sí. En estos microorganismos, los sitios FleQ-1, 2 y 3 mantienen una secuencia inicial muy conservada de 7 residuos TTGCCGC seguidas de 4 residuos de A/T. En el caso del sitio FleQ-4, se mantiene la misma estructura, aunque la secuencia conservada inicial se reduce a 5 residuos (GCCGC) (Fig. 27).

FleQ-1 TTGCCGCTTTTGCCGCC
FleQ-2 TTGCCGCTTTTGTCACCT
FleQ-3 TTGCCGCTTTTCTGGCAT
FleQ-4 --GCCGCAAACCCATA
***** *

Figura 27. Alineamiento de los 4 sitios de interacción con FleQ propuestos en la región promotora PflgB de P. putida KT2440. Los asteriscos azules hacen referencia a nucleótidos conservados en los sitios FleQ-1, 2 y 3, mientras que los verdes hacen referencia a las posiciones conservadas en todos ellos.

Todas las especies estudiadas tienen en común un alto grado de conservación de las secuencias FleQ-2 y FleQ-3. En el caso del sitio FleQ-3, con una homología de hasta 18 pb, sugiriendo la existencia de elementos reguladores relevantes para la activación de este promotor comunes a todas las especies. Por el contrario, los sitios FleQ-1 y 4, únicamente se identifican en las 2 estirpes de *P. putida* estudiadas (KT2440 y F1). También se reconoce una pequeña secuencia de 6 pb localizada aguas arriba del sitio FleQ-3, denominada PreFleQ-3, con un alto grado de conservación en todas las especies estudiadas, pero que no presenta el patrón característico común al resto de posibles sitios de unión de FleQ. De igual manera, se mantienen muy conservadas las regiones -12 (TTGCT) y -24 (TGGCA) del promotor σ^{54} propuesto, apoyando nuevamente la correcta identificación del promotor realizada *in silico* en *P. putida* KT2440 y sugiriendo que la expresión de *flgB* es dependiente del factor σ^{54} en todos los organismos estudiados.

2.13 El sitio FleQ-3 es determinante para la expresión de *PflgB*

Para determinar el efecto sobre la expresión de las secuencias identificadas en el promotor *PflgB*, así como para confirmar la existencia del promotor σ^{54} , se realizó una mutagénesis de cada una de las secuencias relevantes utilizando como base el fragmento $\Delta 1$, renombrado como *PflgB_1*, que contiene la región comprendida entre las posiciones - 263 a +128 con respecto al codón de inicio del gen *flgB* y que incluye a todos los sitios FleQ junto con el promotor identificado tras el alineamiento. La mutagénesis de las secuencias se llevó a cabo mediante PCR solapante usando oligonucleótidos modificados para cada uno de los sitios a mutagenizar. En el caso de los sitios FleQ-1 a FleQ-4 se modificaron de forma extensiva las dos regiones conservadas ricas en C+G, que flanquean los tetranucleótidos constituidos por As o Ts. En la mutagénesis del promotor σ^{54} se modificaron 2 de los residuos más conservados de la región - 24, mientras que se modificaron 4 de las 6 posiciones que constituyen el sitio conservado denominado PreFleQ-3, que no tiene similitud con un posible sitio FleQ. Todos los fragmentos obtenidos fueron digeridos con las enzimas oportunas, clonados en el plásmido pMRB1 y transferidos a la estirpe silvestre KT2442 y al fondo mutante $\Delta fleQ$. Los cambios de secuencia realizados se detallan en la tabla 05.

Plásmido	Sitio mutado	Cambios generados
<i>PflgB_1</i> FleQ1mut	FleQ-1	<u>GCCGCTTTTGCCGC</u> → <u>AGATCTTTTCTAGA</u>
<i>PflgB_1</i> FleQ2mut	FleQ-2	<u>GCCGCTTTTGTCAC</u> → <u>AGATCTTTTCTAGA</u>
<i>PflgB_1</i> FleQ3mut	FleQ-3	<u>GCCGCTTTTCTGGC</u> → <u>AGATCTTTTCTAGA</u>
<i>PflgB_1</i> FleQ4mut	FleQ-4	<u>GCCGCAAAACCCCA</u> → <u>TCTAGAAAAGATCT</u>
<i>PflgB_1</i> prommut	Promotor	<u>TGGCACAGCCCTTGCT</u> → <u>TAACACAGCCCTTGCT</u>
<i>PflgB_1</i> PreFleQ3mut	PreFleQ-3	<u>TCAGGCGGAAGGCC</u> → <u>TCAGGTATGAGGCC</u>

Tabla 05. Cambios introducidos en el promotor *PflgB* mediante mutagénesis por PCR solapante. Las regiones subrayadas hacen referencia a las zonas mutagenizadas.

La actividad β -galactosidasa en fase estacionaria de las diferentes fusiones transcripcionales en cada uno de estos fondos genéticos se representa en la figura 29. El efecto sobre la activación del promotor en la estirpe silvestre (Fig. 29 A) varió considerablemente dependiendo del sitio FleQ mutado. La modificación del sitio FleQ-1, el más alejado del promotor, apenas redujo la expresión 1.2 veces con respecto al promotor *PflgB_1* sin modificar, representando el sitio con menor influencia sobre la activación del promotor de todos los estudiados. Por su parte, la mutación de los sitios

FleQ-2 y FleQ-4 provocó una reducción moderada de 1.95 y 2.2 veces, respectivamente. La mutación del sitio FleQ-3 generó los efectos más drásticos sobre la expresión, que llegó a reducirse 8.6 veces con respecto a los niveles del promotor intacto. Como se observa en el alineamiento de secuencias realizado en el apartado anterior, el sitio FleQ-3 representa el sitio más conservado, con 18 pb que pueden ser encontradas en el promotor *PflgB* de al menos 15 especies de *Pseudomonas* ambientales además de las aquí mencionadas (datos no mostrados).

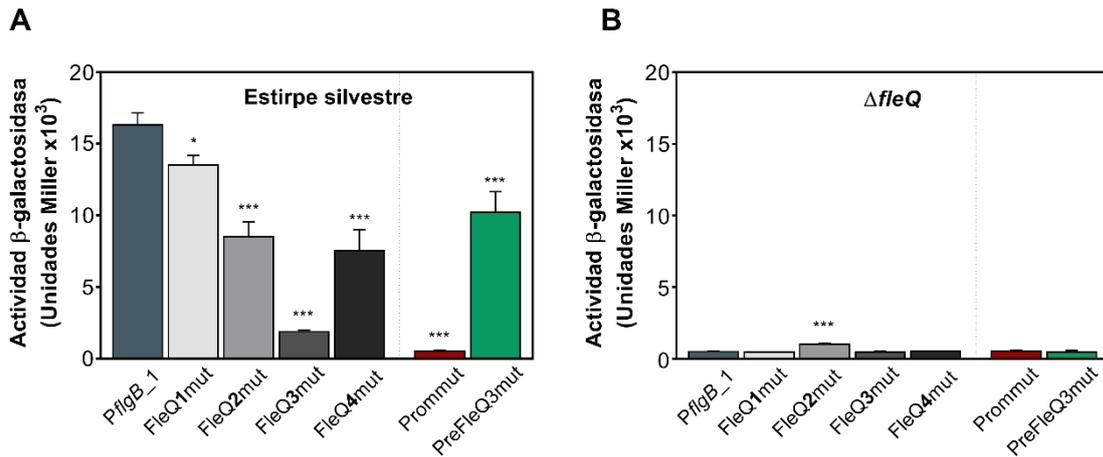


Figura 29. Efecto de las mutaciones de los posibles sitios de unión de FleQ sobre la expresión de *PflgB*. Actividad β -galactosidasa del promotor *PflgB_1-gfp-lacZ* y de sus variantes mutagenizadas en la estirpe silvestre y en el fondo genético $\Delta fleQ$. Las mutaciones de los posibles sitios de interacción con FleQ se agrupan a la izquierda de la línea discontinua. Las mutaciones del resto de secuencias relevantes a la derecha. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. *P<0.05, **P<0.01, *** P<0.001.

La modificación de los residuos más conservados del promotor σ^{54} (*PflgB_1* prommut) redujo la expresión de la fusión transcripcional 30 veces, hasta niveles basales, confirmando que la secuencia identificada *in silico* constituye un promotor. Ninguna otra de las modificaciones introducidas en la región promotora redujo por sí sola los niveles de expresión de forma similar, indicando que únicamente la interrupción del promotor es capaz de eliminar por completo la expresión, y que ningún sitio identificado es completamente imprescindible en el proceso.

En el caso del sitio PreFleQ-3, la mutación de su secuencia provocó una ligera disminución (1.6 veces) de la expresión del promotor *PflgB_1*, lo que sugiere que, a pesar de no presentar la estructura habitual del resto de sitios FleQ, el sitio PreFleQ-3 participa en la activación del promotor. Sin embargo, no es posible descartar que, dada la

proximidad con los sitios FleQ-2 y 3, el efecto sobre la expresión de esta mutación se deba a la modificación estructural de la región.

En el fondo mutante $\Delta fleQ$ (Fig. 29 B), los valores de expresión fueron inferiores en todos los casos a los obtenidos en la estirpe silvestre, confirmando que FleQ es un elemento necesario para la regulación de *PflgB* desde estas secuencias reguladoras. Además, en ausencia de FleQ no se observaron diferencias significativas entre el fragmento *PflgB_1* y el resto de las variantes mutantes, a excepción de un leve incremento en la expresión detectado tras mutagenizar el sitio FleQ-2, indicando que los cambios en la expresión observados al modificar la secuencia en la estirpe silvestre son propiciados por la acción de FleQ.

2.14 La proteína auxiliar IHF participa en la expresión del promotor *PflgB* en *P. putida* KT2440

En muchas ocasiones, la activación de promotores dependientes del factor σ^{54} requiere de la participación de proteínas encargadas de modificar y plegar la estructura del ADN para posibilitar la interacción entre el activador y el promotor. IHF es una de las proteínas encargadas de reordenar el ADN y su papel como coactivador en la expresión de ciertos promotores ha sido previamente descrito en varias especies de *Pseudomonas* (Arvizu-Gómez *et al.*, 2011; Platero *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible establecer una secuencia consenso reconocida por IHF en las diferentes regiones promotoras dada la escasa conservación de los sitios que reconoce (Friedman, 1988). A pesar de ello, las zonas ricas en As y Ts se han demostrado como una característica común a la mayoría de los sitios descritos (Valls *et al.*, 2011), por lo que, dada la presencia de este tipo de regiones en *PflgB* (Fig. 28), se decidió estudiar el papel de IHF en el control de la transcripción. Para conocer la influencia de IHF sobre la expresión del gen *flgB*, se transfirió mediante conjugación triparental la fusión transcripcional *PflgB_1-gfp-lacZ* y el plásmido control pMRB1 a la estirpe silvestre *P. putida* KT2440 y a un mutante de inserción *ihfA::Km* (funcionalmente *ihf*⁻), posteriormente se midió la actividad β -galactosidasa para comprobar la expresión del promotor en fase estacionaria (Fig. 30).

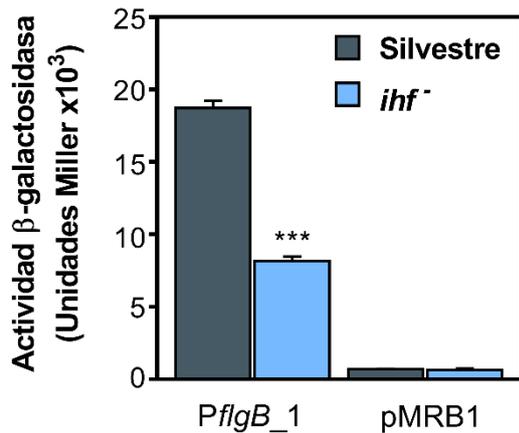


Figura 30. Efecto de la ausencia de *ihf* sobre la expresión de *PflgB_1*. Actividad β -galactosidasa del promotor *PflgB_1* y el plásmido control pMRB1 en la estirpe silvestre y el fondo genético *ihf*⁻. Se muestran valores medios junto a desviación estándar ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia con respecto a la estirpe silvestre. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La ausencia de IHF redujo la expresión del promotor *PflgB_1* 2.3 veces respecto a la estirpe silvestre, indicando que IHF es un elemento relevante para la activación dependiente de FleQ del promotor *PflgB*. Sin embargo, los niveles de expresión independientes de IHF fueron elevados, lo que sugiere que el papel de IHF no es imprescindible para la activación del promotor.

2.15 La orientación en la hélice de ADN del sitio FleQ-3 respecto al promotor es esencial para la activación de *PflgB*

Asumiendo que una vuelta de la hélice de ADN la conforman entre 10.6 y 11 pb (Levitt, 1978), los sitios FleQ identificados en la región promotora *PflgB* se encuentran distanciados por vueltas completas de ADN, de forma que todos ellos se localizan en la misma cara de la hélice de ADN. Los sitios FleQ-1 y 2 se distancian entre sí 2 vueltas completas de hélice (23 pb), mientras que los sitios FleQ-2 y 3, así como FleQ-3 y 4 se encuentran separados 3 vueltas completas de hélice (32 y 33 pb, respectivamente) (Fig. 31).

Dado el efecto que la proteína IHF tiene sobre la expresión, se decidió comprobar si en la activación del promotor interviene un componente estructural. Para ello, se llevó a cabo una modificación estructural del promotor mediante la incorporación de fragmentos que añaden medias vueltas (5/6 pb) o vueltas completas de hélice (11 pb) entre los sitios FleQ-2 y 3, FleQ-3 y 4, y entre FleQ-4 y el promotor σ^{54} . Posteriormente, se estudió la influencia sobre la expresión de *flgB* en cada caso. Dada la escasa relevancia del sitio FleQ-1 en la expresión del promotor (Fig. 29), no se consideró modificación alguna en su estructura para este ensayo. Las modificaciones en el promotor se realizaron mediante mutagénesis por PCR solapante partiendo del fragmento *PflgB_1*. La distancia relativa

entre los sitios de activación, así como las posiciones en las que se llevó a cabo la modificación estructural se representan de forma esquemática en la figura 31. Por su parte, las modificaciones realizadas sobre la secuencia se detallan en la tabla 06.

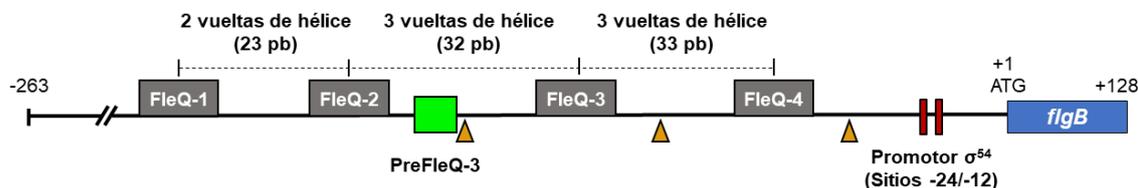


Figura 31. Distancia relativa entre los elementos relevantes del promotor *PflgB_1*. Representación esquemática del promotor *PflgB_1* que incluye desde las posiciones -263 a +128 con respecto al codón de inicio del gen *flgB*. Se muestran en gris los 4 sitios FleQ, en verde el sitio PreFleQ-3 y en rojo las secuencias -12 y -24 del promotor σ^{54} . Los triángulos de color naranja indican las posiciones en las que se introdujeron medias vueltas y vueltas completas de hélice.

Plásmido	Mutación introducida	Cambio introducido
PflgB_1 medvuelt2-3	5 pb entre FleQ-2 y 3	GGAAGGCCT → GGAAGACTAGGCCT
PflgB_1 vueltacomp2-3	11 pb entre FleQ-2 y 3	GGAAGGCCT → GGAAGACTAAGTAACGGCCT
PflgB_1 medvuelt3-4	6 pb entre FleQ-3 y 4	AATCTGACAGT → AATCTGGACTAAACAGT
PflgB_1 vueltacomp3-4	11 pb entre FleQ-3 y 4	AATCTGACAGT → AATCTGGACTAAGTAACACAGT
PflgB_1 medvuelt4-prom	5 pb entre FleQ-4 y el promotor	GCTTTCCAGTGGT → GCTTTCC <u>TTT</u> CCAGTGGT
PflgB_1 vueltacomp4-prom	11 pb entre FleQ-4 y el promotor	GCTTTCCAGTGGT → GCTTTCCGACTAGTTTCCAGTGG

Tabla 06. Resumen de las modificaciones introducidas para el análisis estructural de *PflgB_1*. Se subrayan las regiones incorporadas tras la mutagénesis.

Tras la mutagénesis, los fragmentos obtenidos se clonaron en el plásmido pMRB1 y se midió la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales generadas, que se representa en la figura 32 B. En la figura 32 A, se muestran de forma esquemática tanto la posición como la orientación de los diferentes sitios de activación tras cada una de las modificaciones introducidas.

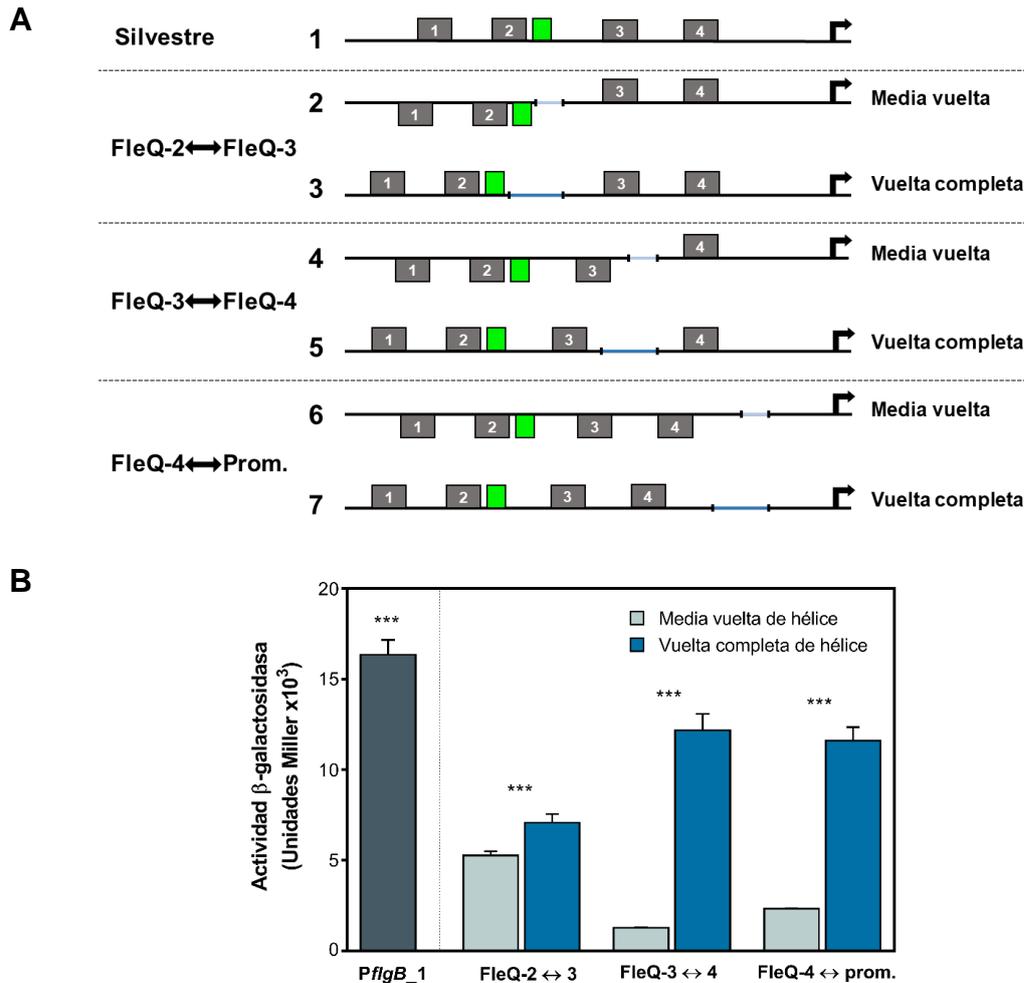


Figura 32. Efecto de las modificaciones estructurales sobre la expresión de *PflgB*. (A) Representación esquemática de la orientación de los sitios relevantes del promotor *PflgB_1* tras las diferentes modificaciones estructurales. En gris se representan los sitios FleQ-1, 2, 3 y 4, y en verde el sitio PreFleQ-3. Las inserciones realizadas en la secuencia se representan en color azul. La flecha de color negro representa el promotor σ^{54} . La posición con respecto a la línea horizontal indica la orientación en la hélice de ADN de cada uno de los sitios. (B) Actividad β -galactosidasa de *PflgB_1-gfp-lacZ* junto con sus variantes en las que se ha insertado media vuelta (5/6 pb) o una vuelta completa de hélice de ADN (11 pb) entre los diferentes sitios FleQ descritos. Se muestran valores medios y la desviación estándar como medida de dispersión ($n \geq 3$). Para el estudio de la significación estadística se llevó a cabo un análisis T-test asumiendo varianzas iguales. Los asteriscos hacen referencia a la diferencia entre las columnas agrupadas. En el caso de los asteriscos sobre *PflgB_1* indican la diferencia con respecto al resto de barras de la gráfica. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Las modificaciones estructurales del promotor tuvieron diferentes efectos sobre la expresión dependiendo de la longitud de la secuencia insertada y de la región modificada. La inserción de media vuelta de hélice entre los sitios FleQ-3 y FleQ-4 o entre el sitio FleQ-4 y el promotor σ^{54} (Fig. 32 A, 4 y 6), que alteran la orientación del sitio principal FleQ-3 respecto al promotor, tuvieron un efecto importante sobre la expresión, que se redujo en 7 y 12.8 veces respecto a la expresión del promotor sin modificar. Por el

contrario, la inserción de una vuelta de hélice completa (11 pb) en los mismos sitios (Fig. 32 A, 7) apenas disminuyó la expresión en 1.4 y 1.3 veces respecto al promotor silvestre. Los bajos niveles de expresión observados al introducir media vuelta de hélice sugieren que la correcta expresión de *PflgB* requiere de una orientación apropiada entre el sitio FleQ-3 y el promotor σ^{54} , mientras que que la orientación relativa del sitio FleQ-4 es irrelevante en la activación.

La inserción de media o una vuelta de hélice entre los sitios FleQ-2 y 3 (Fig. 32 A, 2 y 3) disminuyó la expresión del promotor de forma similar en ambos casos (Fig. 32 B). Este efecto fue similar al observado cuando se alteró la secuencia del sitio FleQ-2 (Fig. 29), sugiriendo que la contribución del sitio FleQ-2 en la regulación se debe a un efecto cooperativo sobre la activación dependiente del sitio FleQ-3 (Fig. 32 A, 6).

Con la información obtenida durante el estudio del promotor *PflgB* de *P. putida* KT2440 podemos afirmar que: (1) Se trata de un promotor dependiente del factor σ^{54} y activado de manera directa por FleQ, en el que (2) se identifican 3 sitios relevantes para la activación por FleQ localizados en la misma cara de la hélice de ADN, siendo el sitio FleQ-3 el que mayor efecto tiene sobre la expresión. (3) La orientación de este sitio respecto al promotor es esencial para la activación y (4) la proteína IHF, encargada de plegar el ADN, participa en este proceso.

Capítulo 3

**Regulación espacial y numérica del
ensamblaje de los flagelos en
Pseudomonas putida KT2442**

3.1 Las proteínas FlhF y FleN participan en la correcta localización y ensamblaje del cuerpo basal del flagelo

Las proteínas FlhF y FleN participan conjuntamente en el control del número de flagelos y su correcta localización en numerosas especies con flagelación polar (Pandza *et al.* 2000; Dasgupta & Ramphal 2001). Por esta razón, la disrupción o la sobreexpresión de los genes que codifican estas proteínas a menudo trae consigo una modificación en el número y la posición de los flagelos, frecuentemente asociada a alteraciones en la movilidad (Murray & Kazmierczak 2006; Kusumoto *et al.* 2006). Para estudiar el papel de FlhF y FleN en la movilidad, se realizaron ensayos de movilidad dependiente de flagelo tipo *swimming* y *swarming* de los mutantes $\Delta flhF$, $\Delta fleN$ y $\Delta flhF \Delta fleN$. Para completar la caracterización, se llevó a cabo una tinción flagelar de las estirpes estudiadas. Como control negativo se empleó la estirpe $\Delta fleQ$, que carece de flagelo y es, por tanto, no móvil. Los resultados de los ensayos se muestran en la figura 33.

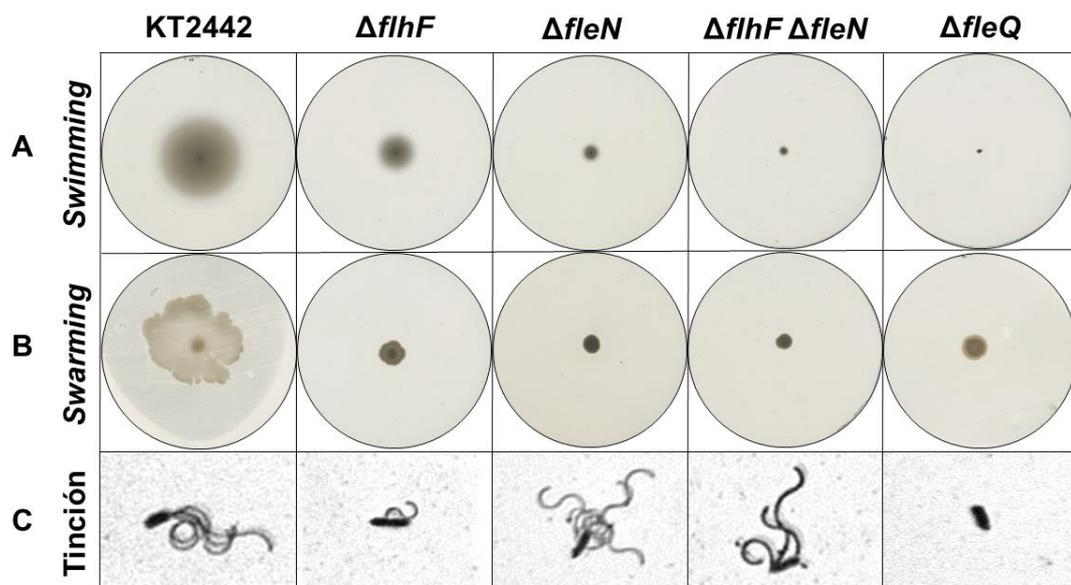


Figura 33. Movilidad tipo *swimming*, *swarming* y tinción flagelar de la estirpe silvestre y diferentes fondos mutantes relacionados con el ensamblaje flagelar. (A) ensayo de movilidad tipo *swimming* en agar semisólido (0.3%) ($n \geq 3$), (B) ensayo de *swarming* ($n \geq 3$) e (C) imágenes de microscopía tras tinción flagelar de la de la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta flhF$, $\Delta fleN$, el doble mutante $\Delta flhF \Delta fleN$ y el mutante aflagelado $\Delta fleQ$.

Como se esperaba, el mutante $\Delta fleQ$ empleado como control negativo fue completamente aflagelado y no móvil (Fig. 33 A, B y C, $\Delta fleQ$). Los mutantes $\Delta flhF$, $\Delta fleN$, así como el doble mutante $\Delta flhF \Delta fleN$ se mostraron flagelados y parcialmente móviles en ensayos de *swimming*, indicando que ninguno de estos dos elementos es indispensable

para la biosíntesis de un flagelo funcional. Sin embargo, estos mutantes sí mostraron alteraciones en el número y la disposición de los flagelos sintetizados (Fig. 33 C). Mientras que en la estirpe silvestre se observó un penacho de entre 3 y 5 flagelos polares, el mutante $\Delta flhF$ presentó uno o en raras ocasiones dos flagelos, a menudo localizados de forma subpolar o lateral, lo que encaja con el papel de FlhF en la determinación de la localización polar del penacho flagelar. Por su parte, el mutante $\Delta fleN$ mostró un penacho de flagelos en localización polar, aunque con un número generalmente mayor de flagelos que la estirpe silvestre (entre 4 y 7). Finalmente, el doble mutante $\Delta flhF \Delta fleN$ mostró una combinación de los fenotipos generados en cada una de las mutaciones individuales, de esta forma se identificaron entre 2 y 4 flagelos dispuestos independientemente en localización polar, subpolar o lateral en la membrana celular. Los tres mutantes de delección estudiados mostraron defectos en su capacidad de *swimming* (Fig. 33 A): el mutante $\Delta flhF$ mostró una reducción del $59 \pm 3 \%$ ($n \geq 3$) en el diámetro del halo de *swimming* respecto a la estirpe silvestre, mientras que los mutantes $\Delta fleN$ y $\Delta flhF \Delta fleN$ mostraron una reducción del $85 \pm 2 \%$ y del $90 \pm 1 \%$ ($n \geq 3$), respectivamente. Finalmente, la capacidad para desplazarse mediante *swarming* fue indetectable en cualquiera de los 3 mutantes estudiados. En conjunto, estos resultados indican que, aunque los tres mutantes de delección estudiados son flagelados y móviles, la alteración en el número y la posición de los flagelos observada posiblemente provoca una disminución en la capacidad para coordinar la rotación flagelar y lograr una capacidad de *swimming* y *swarming* efectiva.

Los patrones de movilidad de las diferentes estirpes mutantes estudiadas se determinaron mediante un ensayo de microscopía acoplada a video. Las trayectorias seguidas en cada caso se muestran en el anexo I. La estirpe silvestre mostró un patrón de movimiento característico con largas carreras y paradas repentinas, a menudo seguidas de periodos con movimientos más lentos, erráticos y con cambios frecuentes de dirección. Por su parte, las carreras largas fueron raramente observadas en el mutante $\Delta flhF$, donde el movimiento errático fue el comportamiento más habitual, incluyendo desplazamientos laterales y diagonales. El mutante $\Delta fleN$ mostró carreras más rápidas que la estirpe silvestre, con menos paradas y cambios de dirección. A menudo, las largas carreras ininterrumpidas tendieron a girar levemente en sentido horario hasta formar trayectorias casi circulares. Finalmente, el comportamiento del doble mutante $\Delta flhF \Delta fleN$ mostró un fenotipo combinado con largas carreras tendentes a desviarse en sentido horario, así como desplazamientos diagonales similares a los observados en el mutante $\Delta flhF$.

Para comprobar cómo afecta la delección de las proteínas FliH y FliN a la localización del cuerpo basal del flagelo *in vivo*, y confirmar el fenotipo de localización aberrante de flagelo observado mediante tinción flagelar, se optó por marcar la proteína FliN mediante una fusión a la proteína fluorescente GFP. FliN forma, junto a las proteínas FliG y FliM, el anillo C en el cuerpo basal del flagelo, una de las primeras estructuras ensambladas (Zhao *et al.*, 1996). El alto número de subunidades de la proteína FliN en esta estructura, así como su localización citoplasmática convierten a esta proteína en una buena candidata para determinar la localización del flagelo. Para llevar a cabo este marcaje, se amplificó mediante PCR la región codificante del gen *fliN* y se clonó en pMRB189, un plásmido que incluye el transposón Tn7 y que contiene una fusión génica a *gfpmut3* aguas abajo del sitio de clonación. El plásmido pMRB198 resultante permite integrar el transposón que expresa la proteína FliN fusionada a GFPmut3 en su extremo carboxilo terminal bajo el control de un promotor inducible por salicilato. La localización de esta proteína se comprobó en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fliH$ y $\Delta fliN$ mediante microscopía de fluorescencia empleando como soporte medio LB diluido al 10% (v/v) solidificado con agarosa 1,8% (p/v) y la concentración de inductor indicada (Fig. 34).

A pesar de los altos niveles de fluorescencia basal observados al expresar ectópicamente FliN, fue posible identificar focos de acumulación en uno de los polos de la mayoría de las células de la estirpe silvestre observadas. Esta localización concuerda con el patrón de flagelación lofotrico observado mediante tinción y descrito por primera vez en *P. putida* por Caroline Harwood en 1989 (Harwood *et al.* 1989). Los focos de FliN observados parecen localizarse exclusivamente en uno de los polos, independientemente de la etapa del ciclo en la que se encuentre la célula. En el mutante $\Delta fliH$, raramente fue posible observar focos definidos de FliN y, en caso de observarse, siempre presentaron localización ectópica, lo que encaja con los resultados obtenidos en los ensayos de tinción flagelar donde se muestra que el mutante $\Delta fliH$ es capaz de ensamblar flagelos, aunque en menor número que la estirpe silvestre y deslocalizados (Fig. 33 C). Por el contrario, en la estirpe mutante $\Delta fliN$, la localización polar de la proteína FliN se hizo más evidente, localizándose en ocasiones múltiples polos de la proteína con localización polar (Fig. 34). Estos resultados sugieren una relación entre el aumento de la localización polar de FliN y los fenómenos de hiperflagelación identificados mediante tinción en el mutante $\Delta fliN$ (Fig. 33). Otro fenómeno recurrente en las células que carecen de FliN es la localización bipolar de FliN, que pudo verse formando focos en ambos polos incluso en células en etapas tempranas del ciclo celular.

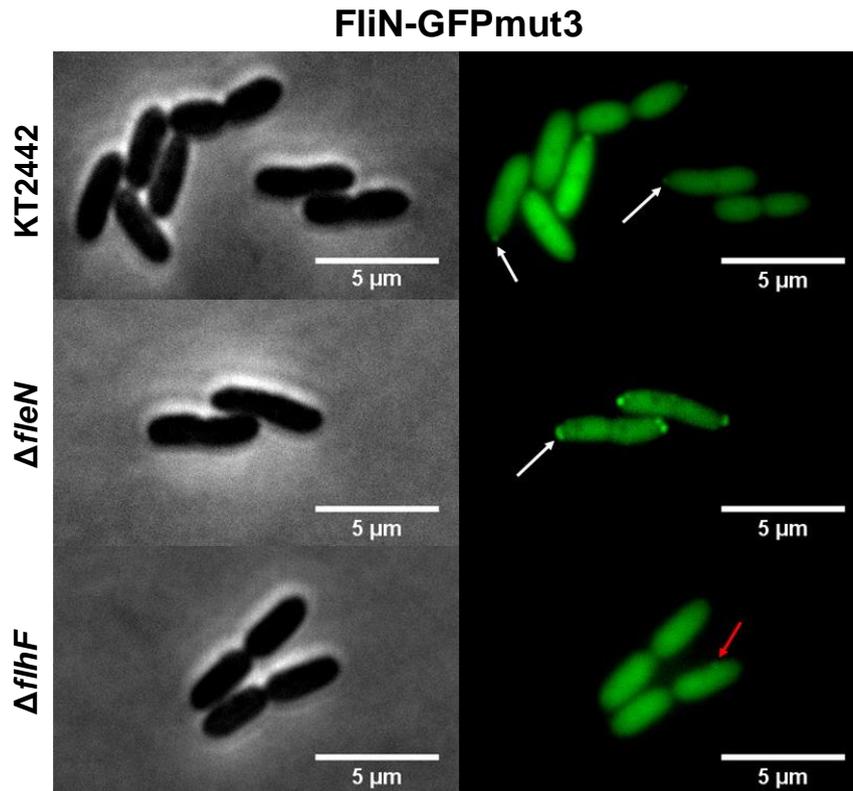


Figura 34. Localización de la proteína FliN en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$. Imagen de microscopía de contraste de fase (columna izquierda) y microscopía de fluorescencia (columna derecha) de la estirpe silvestre KT2442 y los fondos mutantes $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$ expresando de forma heteróloga la proteína FliN fusionada a GFPmut3 en su extremo C-terminal. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos visibles de FliN con localización polar. La flecha roja señala un foco con localización ectópica. En todos los casos la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de salicilato sódico 0,1 mM. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

3.2 FliH se localiza en el polo celular en *P. putida* KT2442

En especies con flagelación monotrica como *P. aeruginosa*, *V. alginolyticus* o *V. cholerae*, FliH se localiza en el polo que porta el flagelo (Murray & Kazmierczak 2006; Kusumoto *et al.* 2009). En el caso de *V. cholerae*, la localización polar de FliH es además requisito indispensable para el reclutamiento de FliF, la primera proteína flagelar ensamblada (Green *et al.* 2009). Para conocer la localización de FliH en *P. putida* KT2442, se llevó a cabo un marcaje fluorescente mediante GFP de la proteína en su extremo C-terminal. En primer lugar, se amplificó mediante PCR la región codificante del gen *flhF* y se clonó en el plásmido pMRB189, que incluye el transposón Tn7 y está diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a GFPmut3 bajo el control de un promotor inducible por salicilato. El plásmido resultante pMRB197 permitió la integración

mediante transposición del sistema de expresión heteróloga de la proteína FlhF en la estirpe silvestre y los diferentes fondos mutantes estudiados. La funcionalidad de esta construcción se comprobó mediante la complementación del mutante $\Delta flhF$ en un ensayo de movilidad tipo *swimming* (Fig. 35), en el que se observó que la expresión heteróloga de FlhF complementa la capacidad de desplazarse en medio semisólido del mutante $\Delta flhF$ hasta alcanzar un diámetro en el halo de movilidad equivalente al de la estirpe silvestre.



Figura 35. Complementación de la movilidad tipo *swimming* de la estirpe mutante $\Delta flhF$. Ensayo de movilidad en agar semisólido (0.3%) mediante picadura de la estirpe silvestre (izquierda), el mutante $\Delta flhF$ (abajo) y el mutante $\Delta flhF$ con la construcción pMRB197 integrada en el genoma (derecha) ($n \geq 3$). Sin inductor en el medio.

Esta construcción fue posteriormente empleada para estudiar la localización de FlhF en la estirpe silvestre mediante un ensayo de microscopía de fluorescencia en el que se tomaron imágenes a intervalos de 15 minutos durante 1 hora (Fig. 36).

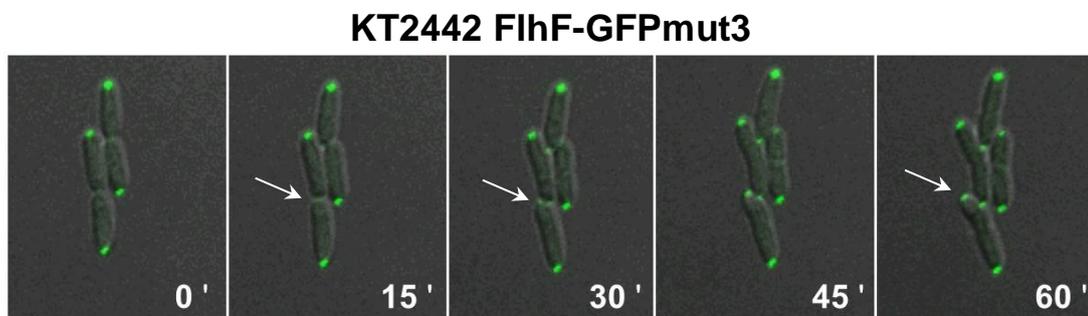


Figura 36. Localización de la proteína FlhF durante el ciclo celular. Imágenes de microscopía confocal de la estirpe KT2442 expresando la proteína FlhF-GFPmut3 marcada en su extremo C-terminal. Se muestra una secuencia temporal de 5 imágenes resultado de la superposición de campo claro y la proyección máxima de las imágenes de fluorescencia. Las flechas blancas señalan uno de los polos en los que FlhF comienza a acumularse inmediatamente tras la división celular hasta alcanzar una concentración similar a la del polo opuesto. La expresión de la proteína no se encuentra inducida. Imágenes tomadas con un microscopio invertido Nikon A1 (objetivo 100X con aceite de inmersión). Sin inductor en el medio.

De acuerdo con los ensayos de microscopía realizados en *P. putida* KT2442 (Fig. 36), FlhF aparece en los polos recién formados tras la división celular y continúa acumulándose a medida que avanza el ciclo. El proceso comienza con FlhF formando un

claro foco en uno de los polos celulares (Fig. 36, tiempo 0). Poco después de finalizar la división celular, se observa la acumulación de FlhF en los polos recién formados (Fig. 36, tiempos 15 y 30). La acumulación en el nuevo polo se hace más evidente a medida que avanza el ciclo, llegando a equipararse la presencia de FlhF en ambos polos poco antes de la siguiente división (Fig. 36, tiempo 60). Este patrón se repitió sin variaciones en todas las células observadas y a lo largo de diferentes generaciones. Prácticamente la totalidad de la proteína producida es capaz de localizarse correctamente y su presencia en el citoplasma es residual. Estos resultados indican que la afinidad de FlhF por los polos celulares es alta y estable.

3.3 La localización polar de FlhF es independiente del resto de componentes flagelares

Dado que la delección de *fleN* tiene un efecto evidente sobre la acumulación de la proteína FliN en el polo flagelado (Fig. 34), cabe preguntarse si este fenómeno afecta también a la localización o acumulación de FlhF. Para comprobar si la localización polar de FlhF es dependiente de la presencia de FliN, se integró el transposón contenido en el plásmido pMRB197, que expresa la proteína de fusión FlhF-GFPmut3, en la estirpe mutante $\Delta fleN$, y se comprobó su localización mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 37).

En comparación con la localización estable que presenta FlhF en la estirpe silvestre, en el mutante $\Delta fleN$ fue posible encontrar diferencias en la localización de FlhF entre distintas células. A pesar de que en la mayoría de las células FlhF mantuvo una localización polar indistinguible de la estirpe silvestre (Fig. 37, flechas blancas), se identificaron células con múltiples focos en los polos, en ocasiones con localización subpolar (Fig. 37, flechas rojas), así como células con focos más amplios y difusos que se disponen de forma curvada tapizando el polo celular (Fig. 37, flechas azules), lo que sugiere que FliN podría jugar un papel en la localización y la acumulación de FlhF en los polos.

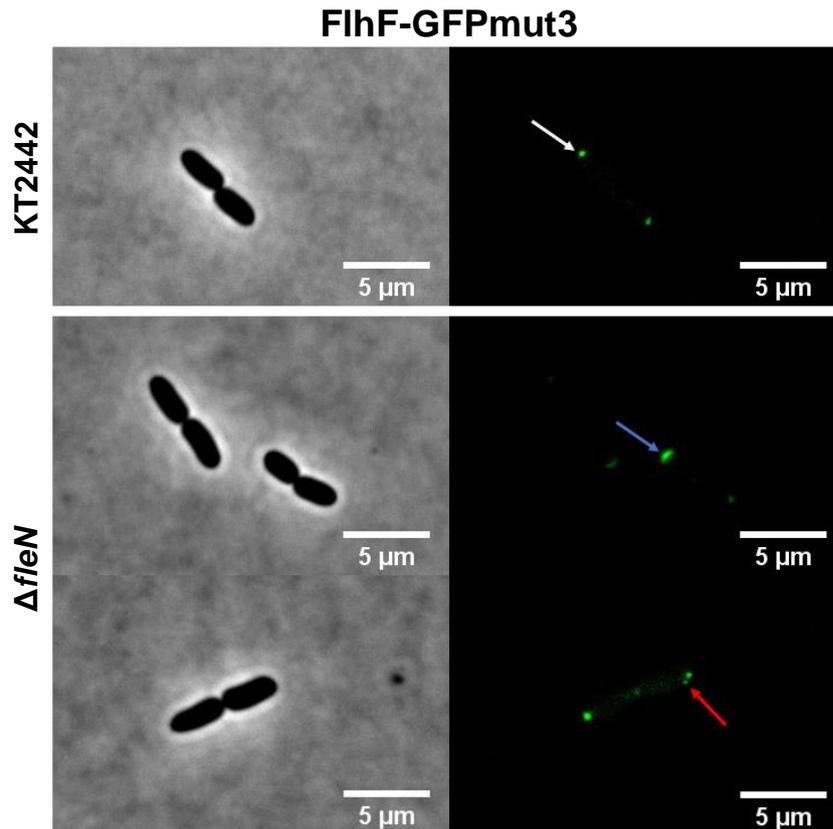


Figura 37. Localización de FlhF en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fleN$. Imagen de microscopía de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fleN$ expresando de forma heteróloga la proteína FlhF-GFPmut3 en su extremo C-terminal. La flecha blanca indica alguno de los focos polares de FlhF, la flecha roja señala localizaciones subpolares de la proteína, mientras que la flecha azul indica acumulaciones polares. En todos los casos la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de salicilato sódico 0,1 mM. Imágenes tomadas con un microscopio confocal Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) y soporte de agarosa.

El proceso de localización y ensamblaje flagelar en *P. putida* se encuentra aún poco estudiado y no es descartable la participación de elementos adicionales que por el momento no han sido identificados. Para comprobar si existen otras proteínas del clúster flagelar implicadas en la correcta localización de FlhF, se expresó la proteína en el mutante $\Delta fleQ$, estirpe aflagelada incapaz de expresar la mayoría de los componentes flagelares, y en *E. coli* DH5 α , un fondo genético que no presenta ortólogos de la proteína FlhF y con un patrón de flagelación peritrico, diferente al de *P. putida*. Para ello, el transposón contenido en el plásmido pMRB197, que expresa la proteína FlhF fusionada a GFPmut3, se integró en la estirpe mutante $\Delta fleQ$ de forma similar al resto de estirpes, y se transfirió por transformación a la estirpe de *E. coli*, donde el plásmido es capaz de replicarse. La localización de FlhF en ambas estirpes se comprobó mediante microscopía confocal (Fig. 38).

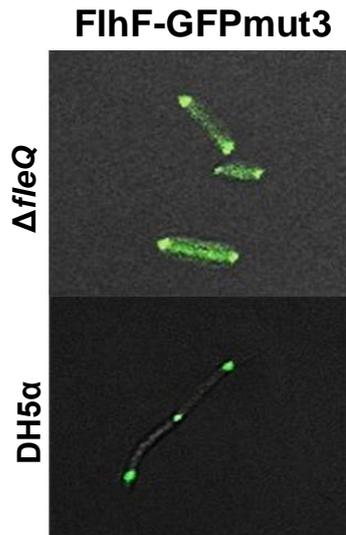


Figura 38. Localización de FlhF en el mutante $\Delta fleQ$ y *E. coli* DH5 α . Imágenes de microscopía confocal resultado de la superposición de campo claro y la proyección máxima de las imágenes de fluorescencia de la estirpe mutante $\Delta fleQ$ y *E. coli* DH5 α expresando la proteína FlhF-GFPmut3 marcada en su extremo C-terminal. En el caso del mutante $\Delta fleQ$, se adicionó salicilato sódico 0,5 mM como inductor. No se añadió inductor para la muestra de *E. coli*. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido Nikon A1 (objetivo 100X con aceite de inmersión).

FlhF localizó en los polos celulares en el mutante $\Delta fleQ$, lo que sugiere que es capaz de reconocer y fijarse a los polos celulares sin la mediación o el preensamblaje de ninguno de los componentes del flagelo, que no son expresados en este fondo genético (Fig. 38). Sorprendentemente, FlhF también formó focos claramente localizados en los polos en *E. coli* DH5 α . Estos resultados sugieren que la proteína FlhF de *P. putida* KT2442 presenta una capacidad intrínseca para reconocer y unirse al polo celular.

3.4 FlhF se acumula en cualquier momento del ciclo celular y su localización no requiere de la presencia del septo de división o polos celulares

Tal y como se ha demostrado en apartados anteriores, FlhF es capaz de localizar en el polo celular en estirpes aflageladas como $\Delta fleQ$ (sección 3.3). Con esta información cabe preguntarse si es el polo en sí mismo el elemento reconocido por FlhF durante su localización. Para responder a esta pregunta se realizó un ensayo de localización mediante microscopía de fluorescencia empleando cefsulodina, un compuesto que inhibe la acción de la transpeptidasa tardía PBP3 (también llamada FtsI) impidiendo la formación del septo y, en consecuencia, la división en *Pseudomonas*. De esta forma, las células tratadas con cefsulodina a concentraciones subinhibitorias se elongan hasta formar largos filamentos sin septos (Gotoh *et al.*, 1990). En el ensayo, se emplearon las estirpes KT2442::TpMRB197 y $\Delta fleN$::TpMRB197, ambas expresando la proteína FlhF fusionada a GFP bajo el control de un promotor inducible por salicilato. Las células fueron cultivadas hasta fase exponencial y posteriormente sembradas sobre un soporte de agarosa suplementado con cefsulodina 300 mg/mL. Una vez formados los filamentos, se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia (Fig. 39).

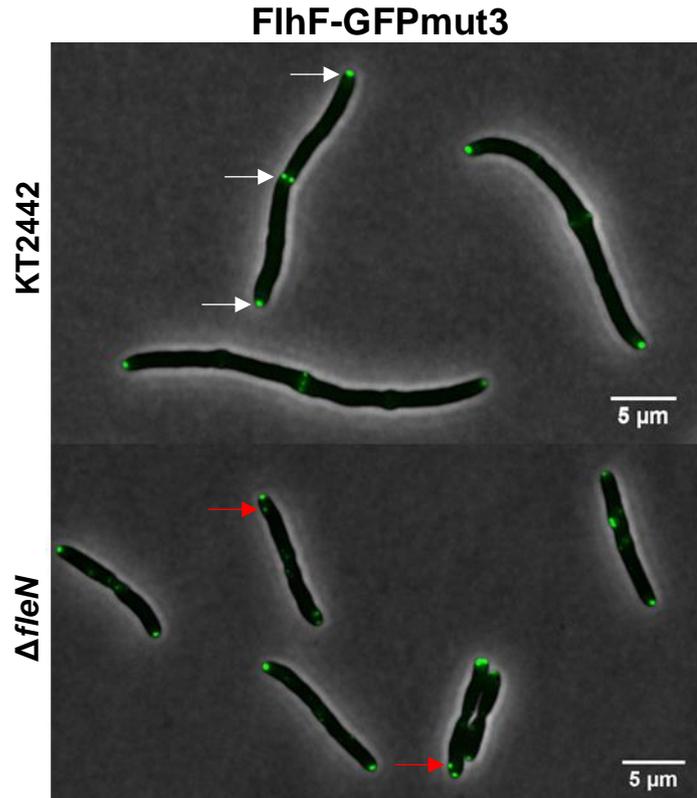


Figura 39. Localización de FlhF en células tratadas con cefsulodina de la estirpe silvestre KT2442 y el mutante $\Delta fleN$. Imágenes de microscopía resultado de la superposición de las imágenes de campo claro y fluorescencia de la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fleN$ expresando de forma heteróloga la proteína FlhF fusionada a GFPmut3. Las flechas de color blanco indican las zonas de acumulación de FlhF homogéneamente distribuidas. Las flechas de color rojo señalan las acumulaciones deslocalizadas de FlhF a lo largo del filamento. En todos los casos la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de salicilato sódico 0,1 mM. Se adicionó cefsulodina 300 mg/mL para bloquear la septación. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

En la estirpe silvestre, FlhF localizó en ambos polos celulares y a lo largo del filamento aseptado siguiendo un patrón de distribución regular (Fig. 39). Este patrón parece coincidir con los lugares en los que habría de formarse el septo, lo que sugiere que FlhF no reconoce ninguna de las características físicas del polo (como la curvatura o la composición específica del peptidoglicano en esta región). Dado que la inhibición de la septación producida por la cefsulodina es principalmente estructural, es posible que FlhF reconozca elementos moleculares, cuya localización no es sensible a la presencia de cefsulodina, encargados de la localización del septo en el ecuador celular.

En el caso del mutante $\Delta fleN$, FlhF mantuvo de forma mayoritaria su localización polar, aunque fue posible observar focos deslocalizados (Fig. 39, flechas rojas) o polos donde FlhF se acumuló formando más de un foco. Estos resultados concuerdan con los

obtenidos en células sin tratar del mutante $\Delta fleN$ (Fig. 37) donde FlhF genera focos con localización subpolar, además de células con más de un foco en sus extremos.

Dado que la localización polar de FlhF no parece depender de características físicas propias del polo ni de ninguno de los elementos presentes en el clúster flagelar, se decidió estudiar si la acumulación polar de FlhF tiene lugar durante un periodo temporal concreto o si es capaz de acumularse en cualquier momento del ciclo celular. Con este propósito, se llevó a cabo un ensayo de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo, conocido como FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Esta técnica permite eliminar la emisión de fluorescencia en una localización muy concreta de la muestra mediante sobreexcitación y monitorizar la reacumulación del fluoróforo en la zona fotoblanqueada a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo este ensayo se empleó la estirpe KT2442::TpMRB197, que expresa ectopicamente la proteína FlhF fusionada a GFP, partiendo de 2 células hijas en la etapa inmediatamente posterior a la división celular (Fig. 40).

Al inicio del ensayo, FlhF está presente de forma predominante en los polos más antiguos, y comienza a acumularse en los polos recién formados (Fig. 40, prefotoblanqueo). Para conocer si, una vez concluida la división celular, FlhF pierde la capacidad de acumularse en el polo más antiguo, se hizo incidir un haz láser sobre uno de ellos y se monitorizó la dinámica de reaparición de la fluorescencia. La incidencia del láser eliminó por completo la fluorescencia en el polo antiguo (Fig. 40, 0 minutos). Sin embargo, las moléculas de FlhF fueron capaces de acumularse de manera evidente en el polo fotoblanqueado (Fig. 40, 5 y 9 minutos), lo que sugiere que FlhF no requiere de una ventana temporal específica para su acumulación, y que los elementos que permiten la correcta localización de FlhF en el polo continúan presentes tras la división bacteriana.

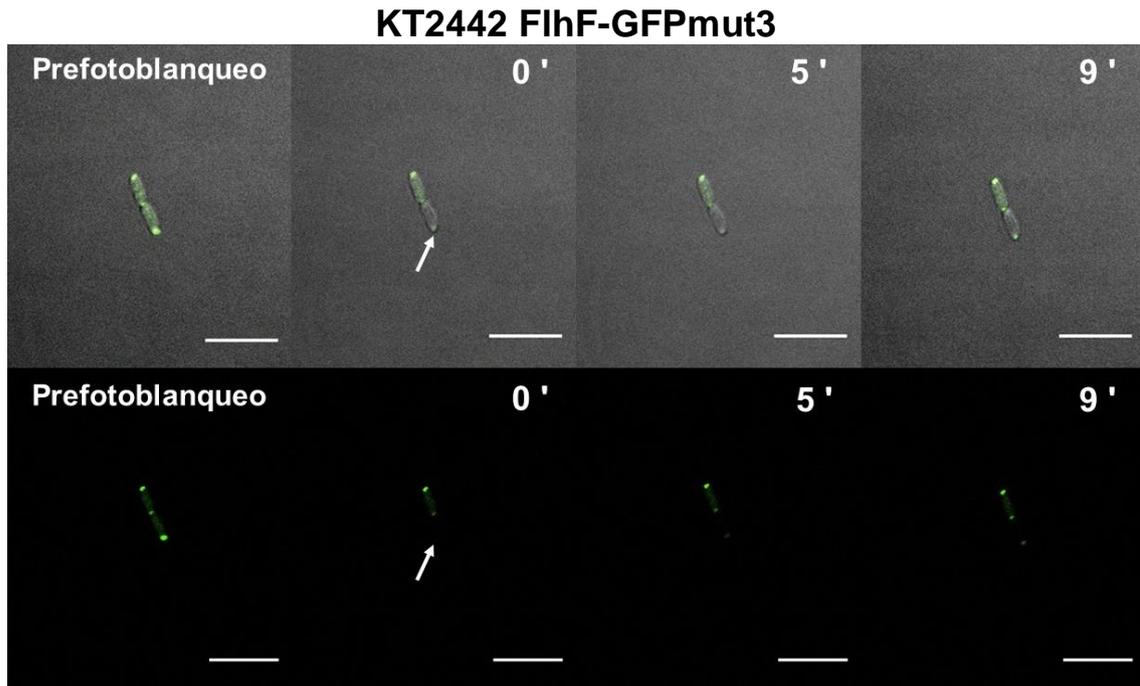


Figura 40. Acumulación de FlhF en el polo celular tras fotoblanqueo. Ensayo de recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo en la estirpe KT2442::TpMRB197, que expresa la proteína FlhF-GFP mediante un sistema inducible por salicilato. Se muestran las imágenes superpuestas de campo claro y confocal (fila superior) y las correspondientes a la proyección máxima de fluorescencia (fila inferior) de un único campo visual. La flecha blanca indica el lugar de incidencia del haz láser. La barra de escala representa 5 μ M en todas las imágenes. Se adicionó salicilato sódico 0.1mM como inductor de la expresión. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido Nikon A1 (objetivo 100X con aceite de inmersión).

3.5 FimV participa en la movilidad dependiente de flagelo en *P. putida* KT2442

En diferentes especies de *Vibrio* se ha descrito recientemente un elemento regulador denominado HubP implicado en el control numérico del flagelo y la localización polar de la maquinaria de quimiotaxis (Takekawa *et al.*, 2016; Yamaichi *et al.*, 2012). FimV, su ortólogo en *Pseudomonas* spp., participa en el reclutamiento de los *pili* de tipo IV en los futuros sitios de división celular (Carter *et al.*, 2017). Estas evidencias, junto a la presencia de un dominio de unión a peptidoglicano en su estructura, hacen de FimV un elemento a tener en cuenta como posible proteína reclutadora de diferentes complejos en el polo celular. El gen *fimV* (*pp1993*) se encuentra localizado fuera de clúster flagelar y no se tienen datos que indiquen que pueda estar co-regulado con genes flagelares. Para determinar si FimV juega un papel, directo o indirecto, en la movilidad de *P. putida* KT2442, se construyó un mutante Δ *fimV* y se realizaron ensayos de movilidad tipo *swimming* y *swarming* empleando la estirpe silvestre KT2442 y el mutante de delección Δ *fleQ* como controles (Fig. 41).

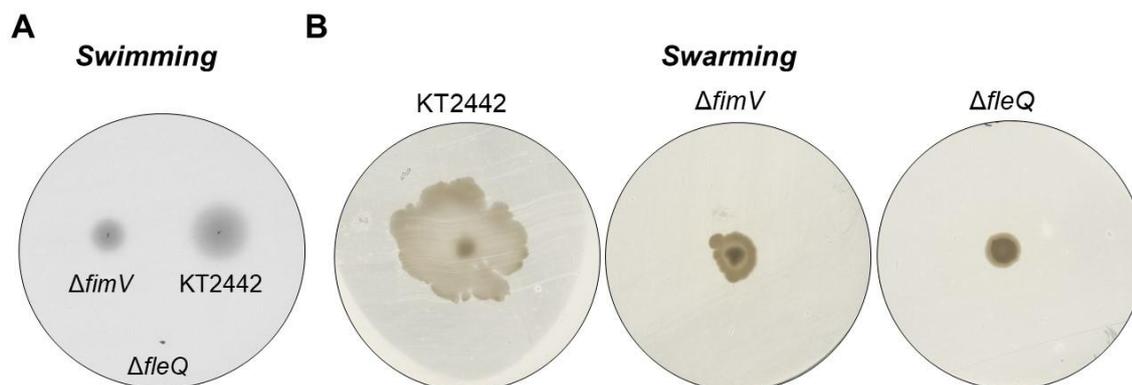


Figura 41. Efecto de la delección de *fimV* sobre la movilidad tipo *swimming* y *swarming*. (A) ensayo de movilidad tipo *swimming* en agar semisólido (0.3%) mediante picadura ($n \geq 3$). (B) ensayo de movilidad tipo *swarming* ($n \geq 3$).

Como se observa en la figura 41 A, la delección de *fimV* afectó la capacidad de desplazarse de *P. putida* KT2442. La delección de *fimV* redujo un $48 \pm 4 \%$ ($n \geq 3$) el diámetro del halo de *swimming* formado con respecto al de la estirpe silvestre. La movilidad en superficie tipo *swarming* (Fig. 41 B) también se vió reducida de forma considerable en el mutante que carece de FimV, si bien la comparación con el mutante aflagelado $\Delta fleQ$ confirma que el mutante $\Delta fimV$ presenta ambos tipos de movilidad (Fig. 41).

Una vez comprobada la implicación de FimV en la movilidad, se realizó un marcaje fluorescente mediante fusión de GFP al extremo C-terminal de la proteína para comprobar su localización en *P. putida* KT2442. Para ello, se siguió un proceso muy similar al empleado para el marcaje de las proteínas FliH y FliN. En primer lugar, se amplificó mediante PCR la región codificante del gen *fimV* y posteriormente se clonó en el plásmido pMRB189, diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a GFPmut3 bajo el control de un promotor inducible por salicilato, y que permite su integración en el genoma mediante transposición. El transposón contenido en la construcción resultante, denominada pMRB236, se integró en el fondo mutante $\Delta fimV$ para comprobar su funcionalidad mediante la complementación del fenotipo en un ensayo de movilidad tipo *swimming* (Fig. 42).

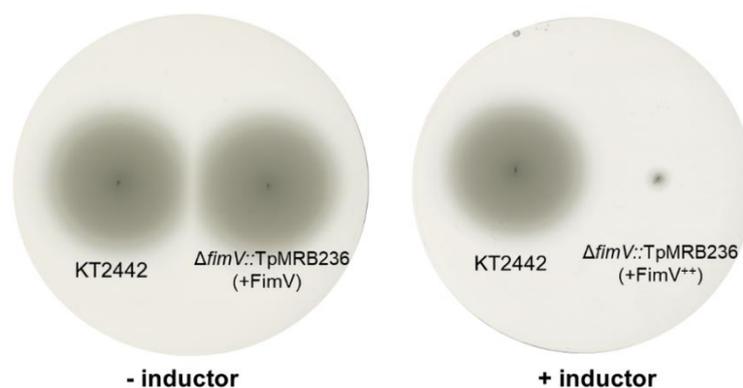


Figura 42. Complementación de la movilidad tipo *swimming* de la estirpe mutante $\Delta fimV$. Ensayo de movilidad en agar semisólido (0.3%) mediante picadura de la estirpe silvestre (izquierda en ambas placas) y el mutante $\Delta fimV$ TpMRB236 (derecha en ambas placas). La placa izquierda no contiene inductor en el medio. En la placa derecha se adicionó salicilato sódico 0.1 mM como inductor.

La complementación del fenotipo de movilidad en el mutante $\Delta fimV$ únicamente se consiguió cuando la proteína FimV-GFPmut3 fue expresada a niveles basales, en ausencia de inductor (Fig. 42, placa izquierda). El aumento de la expresión de FimV-GFP producido por la adición del inductor redujo drásticamente la capacidad de desplazarse mediante *swimming* de la bacteria (Fig. 42, placa derecha). Si bien, este incremento en la expresión de FimV también produjo un efecto negativo sobre el crecimiento (resultados no mostrados) que podría explicar la ausencia de halo en el ensayo de *swimming*.

3.6 La sobreexpresión de *fimV* en *P. putida* provoca la aparición de morfologías celulares aberrantes

Dados los efectos sobre el crecimiento celular que tiene la sobreexpresión de FimV y la imposibilidad para determinar la capacidad de desplazarse mediante *swimming* de la estirpe que lo sobreexpresa, se decidió llevar a cabo un ensayo de microscopía para comprobar *in situ* el fenotipo de movilidad. Para ello, se empleó la estirpe KT2442::TpMRB236, que contiene el transposón que expresa la proteína FimV fusionada a GFP en su extremo C-terminal bajo el control de un promotor inducible. La muestra se observó al microscopio confocal usando salicilato sódico 0.1 mM como inductor de la expresión en el medio (Fig. 43).

La sobreexpresión de *fimV* generó procesos de división asimétrica que llevaron a la formación de células con morfologías aberrantes (Fig. 43), siendo en todos los casos inmóviles. En estas células, FimV se dispuso principalmente tapizando la membrana y de forma más intensa en los polos. Ambos fenotipos podrían indicar que, bien directa o

indirectamente, FimV participa en los procesos que regulan la localización del septo y la división celular en *P. putida* KT2442. Así, la ausencia de movilidad podría ser un efecto indirecto de los graves defectos morfológicos observados, y explicaría la ausencia de halo en la estirpe $\Delta fimV::TpMRB236$ cuando se adiciona inductor al medio en el ensayo de *swimming* (Fig. 42, placa derecha). La morfología aberrante también fue detectada al sobreexpresar FimV en las estirpes mutantes $\Delta fleN$, $\Delta flhF$ y $\Delta fleQ$ (Fig. 43), indicando que la aparición de este fenotipo no guarda relación con ninguna de estas proteínas.

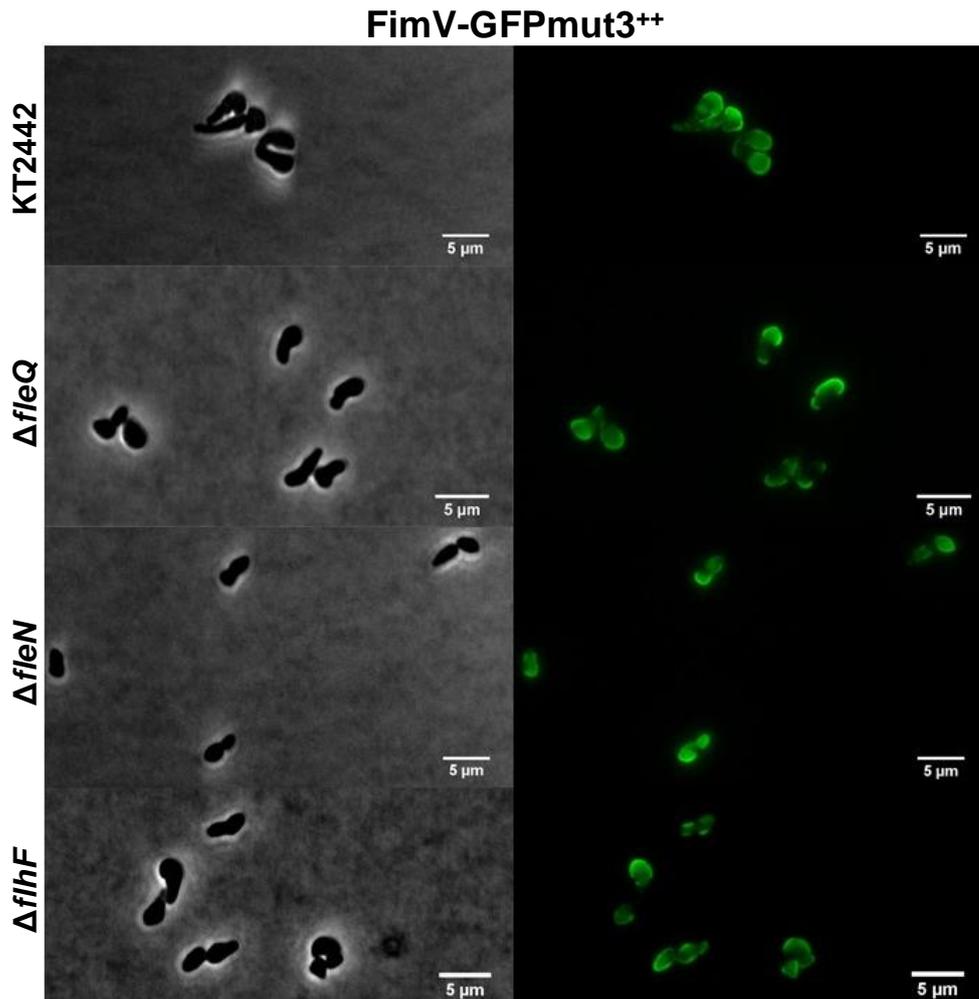


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de la proteína FimV en la estirpe silvestre y diferentes fondos mutantes. Imágenes de microscopía de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de la estirpe silvestre expresando de forma heteróloga la proteína FimV fusionada a GFPmut3 en su extremo C-terminal. Se empleó salicilato sódico 0.1 mM como inductor en el medio. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

3.7 FimV localiza en los polos celulares en *P. putida* KT2442

Tras comprobar la correcta funcionalidad de la construcción que expresa FimV en ausencia de inductor, se observó su localización en células de la estirpe silvestre KT2442 y los fondos genéticos mutantes $\Delta fleN$ y $\Delta flhF$ mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 44).

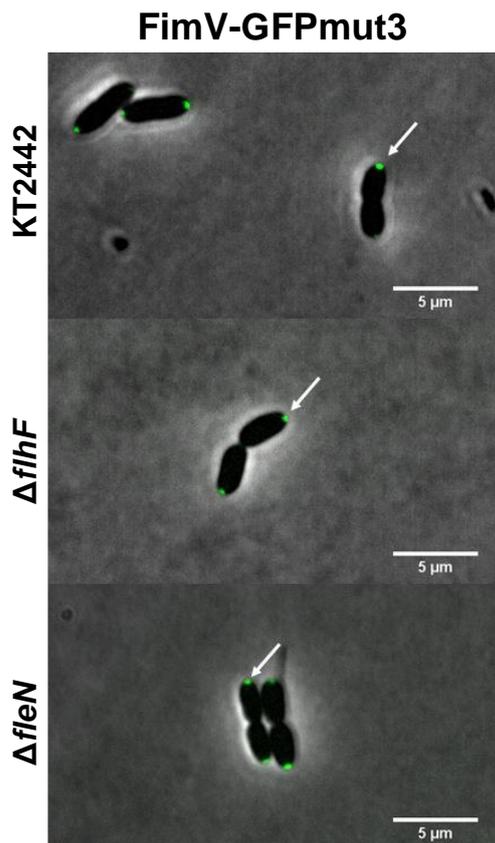


Figura 44. Localización de FimV en la estirpe silvestre KT2442 y los fondos mutantes $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$. Imágenes de microscopía resultado de la superposición de las imágenes de campo claro y fluorescencia de la estirpe silvestre, $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$ expresando de forma heteróloga la proteína FimV fusionada a GFPmut3 en su extremo C-terminal. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos polares de FimV. Sin inductor en el medio. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

Tal y como se muestra en la figura 44, la localización de FimV en la estirpe silvestre formó pequeños focos en los polos celulares, en contraposición con la distribución mas generalizada y tapizando los polos celulares observada al incrementar los niveles de expresión con salicilato (Fig. 43). Esta distribución concuerda con la descrita previamente para FimV en otras especies con flagelación polar (Rossmann *et al.*, 2015; Takekawa *et al.*, 2016), y con la localización de FlhF en *P. putida* descrita en apartados anteriores. No se observaron variaciones en la localización de FimV en el mutante $\Delta fleQ$, incapaz de expresar los componentes del clúster flagelar (no mostrado), ni en los mutantes $\Delta flhF$ o $\Delta fleN$ (Fig. 44), lo que sugiere que FimV es capaz de localizar y anclarse al polo sin la participación de otras estructuras implicadas en el ensamblaje flagelar. En el mutante $\Delta fleN$ tampoco se apreciaron focos con localización subpolar o fenómenos de sobreacumulación de FimV que sí pudieron identificarse al estudiar la localización de FlhF

en este mismo mutante. Estos datos sugieren que FleN participa en el correcto reconocimiento y reclutamiento de FlhF en el polo, aunque no cumpliría esta función en la localización de FimV.

Dada la presencia de un motivo de unión a peptidoglicano en la estructura de FimV y la afinidad que muestra por el polo celular, se decidió comprobar su localización en células tratadas con cefsulodina (Fig. 45)

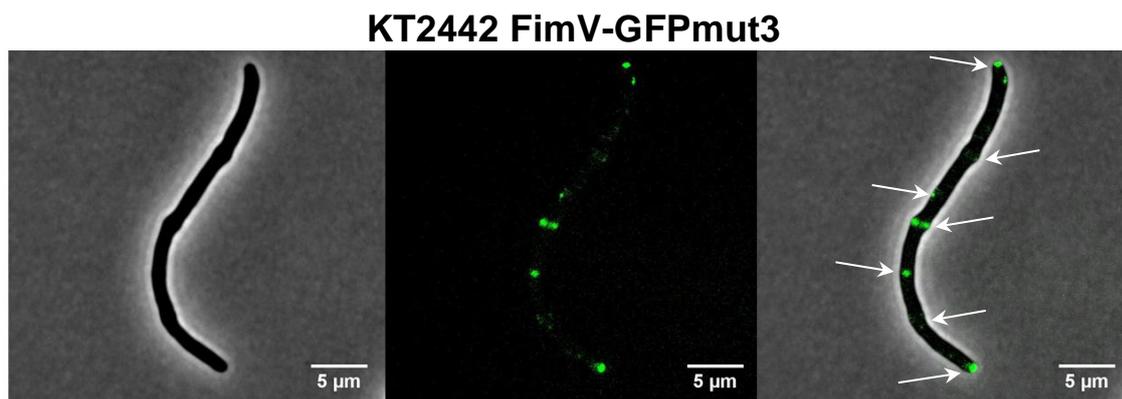


Figura 45. Localización de FimV en células sin septo de la estirpe silvestre. Imagen de microscopía de contraste de fase (izquierda), de fluorescencia (centro) y la superposición de ambas (derecha) de la estirpe silvestre expresando la proteína FimV-GFP en presencia de concentraciones subinhibitorias de cefsulodina (300 mg/ml). Las flechas de color blanco indican las zonas de acumulación de FlhF distribuidas a lo largo del filamento. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMi8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

FimV no mantuvo una distribución homogénea a lo largo del filamento sin septos (Fig. 45). Sin embargo, fue capaz de localizar formando focos en zonas alejadas de los polos celulares, indicando que su localización no depende de ni de la formación previa del septo de división ni de los polos celulares. Para conocer si el elemento reconocido por FimV es específico de *P. putida* o si por el contrario se trata de un elemento conservado en otras especies bacterianas, se expresó de forma heteróloga la proteína FimV-GFP en la especie *E. coli* DH5 α (Fig. 46), que carece de los elementos reguladores del flagelo presentes en *Pseudomonas* spp.

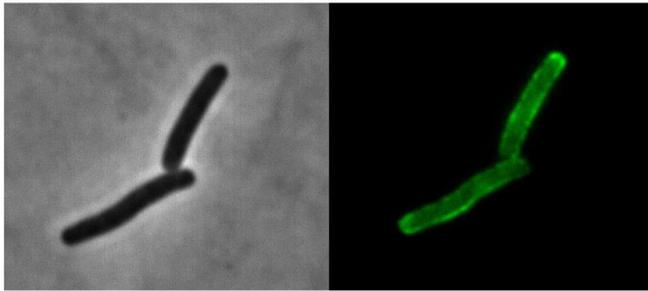
DH5 α FimV-GFPmut3

Figura 46. Localización de FlimV en *E. coli* DH5 α . Imágenes de contraste de fase (izquierda) y microscopía de fluorescencia (derecha) de la estirpe *E. coli* DH5 α expresando la proteína FimV-GFPmut3 marcada en su extremo C-terminal. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMi8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

Como se aprecia en la imagen, FimV perdió su localización polar y fue incapaz de formar focos reconocibles en *E. coli*. En este fondo genético, FimV mostró cierta afinidad por la membrana, donde se localizó con mayor intensidad, aunque sin formar focos de acumulación. FlhF, por su parte, sí mantuvo la localización polar en *E. coli* (Fig. 38), lo que pone de manifiesto que existen diferencias en los elementos reconocidos por FlhF y FimV.

3.8 FliN mantiene su localización polar en ausencia de FimV

Para comprobar si la delección de *fimV* afecta al ensamblaje o la localización del aparato flagelar, se integró el transposón contenido en el plásmido pMRB198, que expresa de forma heteróloga la proteína de fusión FliN-GFP, en la estirpe silvestre y en el fondo mutante $\Delta fimV$, y se comprobó la localización mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 47).

Las imágenes muestran que FliN mantuvo su localización polar en ausencia de FimV en la mayoría de las células observadas, sugiriendo que el sistema flagelar conserva su localización polar en este mutante. Además, de forma similar a como ocurre en el mutante $\Delta fleN$ (Fig. 44), en la estirpe mutante $\Delta fimV$ también se observaron fenómenos de deslocalización de FliN hacia posiciones subpolares (Fig. 47, flecha roja).

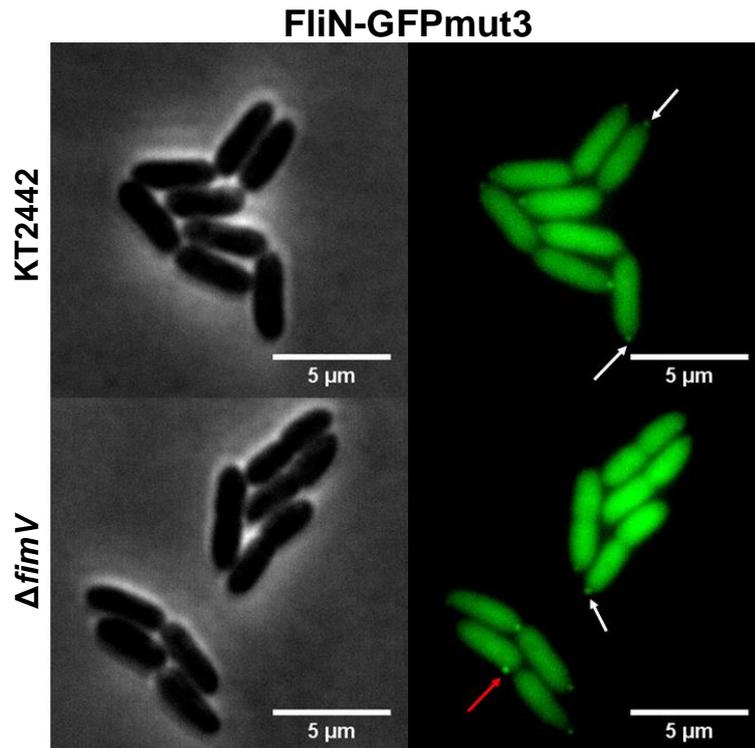


Figura 47. Localización de la proteína FliN en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fimV$. Imagen de microscopía de contraste de fase (columna izquierda) y de fluorescencia (columna derecha) de la estirpe silvestre y del fondo genético mutante $\Delta fimV$ expresando de forma heteróloga la proteína FliN fusionada a GFPmut3 en su extremo C-terminal. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos visibles de FliN localizados en el polo mientras que la flecha roja señala un foco deslocalizado. En todos los casos la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de salicilato sódico 0,1 mM. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMI8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

3.9 La delección de *fimV* altera la localización y la dinámica de acumulación de FliH a lo largo del ciclo celular

Como se muestra previamente, FliH localiza en los polos celulares en la estirpe silvestre. Durante la división celular, comienza a acumularse cerca del septo y cuando el proceso concluye es posible observarla en los polos recién formados (Fig. 35). Para comprobar si la delección de *fimV* afecta al comportamiento de FliH en la célula, se integró el transposón contenido en el plásmido pMRB197, que expresa la proteína FliH fusionada a GFP en su extremo C-terminal, en el fondo mutante $\Delta fimV$. Posteriormente, se observó la localización de la proteína mediante microscopía confocal. En la figura 48 se representa la secuencia temporal de la localización a lo largo de varias generaciones.

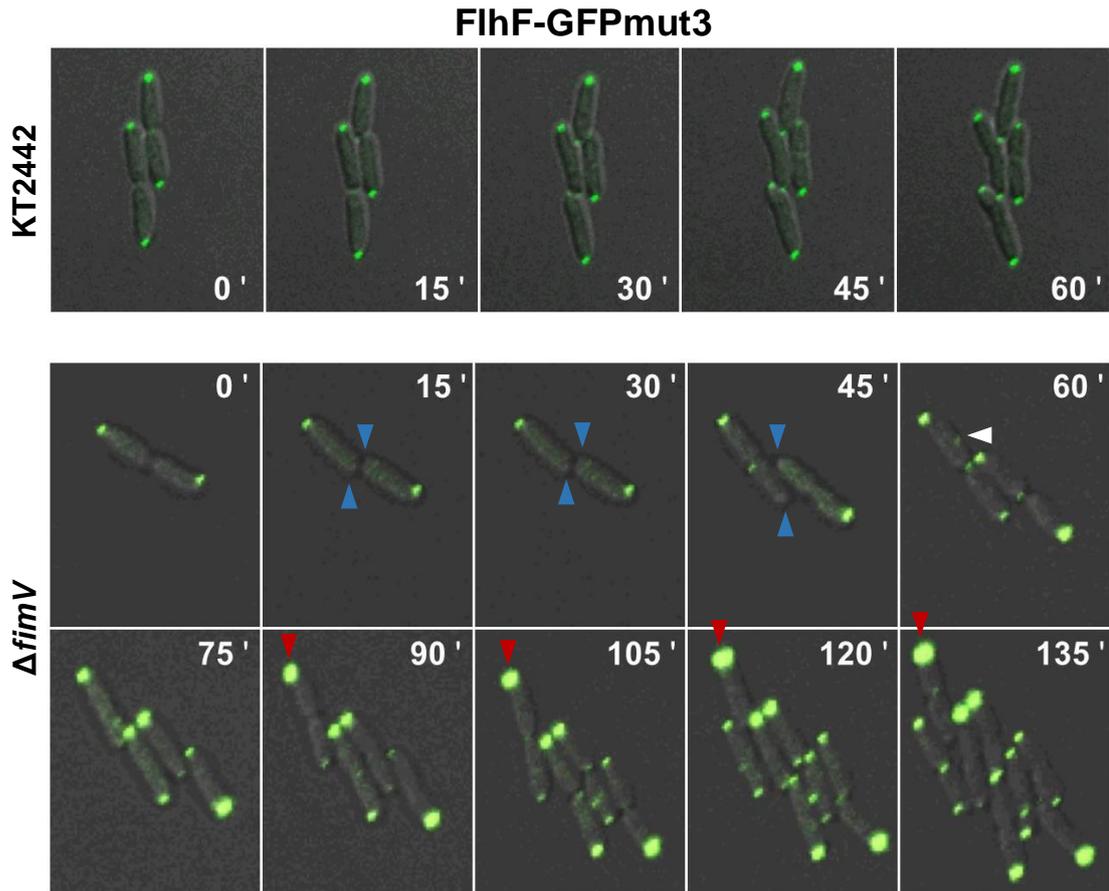


Figura 48. Localización y dinámica de acumulación de FlhF en la estirpe silvestre y el mutante $\Delta fimV$. Imágenes de microscopía confocal de la estirpe KT2442 (arriba) y la estirpe mutante $\Delta fimV$ (abajo) expresando de forma ectópica la proteína FlhF-GFPmut3 marcada en su extremo C-terminal. Se muestra una secuencia temporal de imágenes a intervalos de 15 minutos resultado de la superposición de campo claro y la proyección máxima de las imágenes de fluorescencia. Los triángulos azules señalan los polos huérfanos, donde no se acumula FlhF; los triángulos blancos hacen referencia a focos deslocalizados y los triángulos rojos señalan polos donde FlhF se acumula anormalmente. Se añadió salicilato sódico 0.1 mM como inductor de la expresión. Imágenes tomadas con un microscopio invertido Nikon A1 (objetivo 100X con aceite de inmersión).

En el mutante $\Delta fimV$, la mayoría de las células estudiadas localizaron FlhF de manera indistinguible de la estirpe silvestre; sin embargo, fue posible detectar células que, a lo largo de las generaciones, mostraron hasta 3 tipos de alteraciones respecto a la dinámica descrita previamente: 1) Tras la división celular, los polos recién formados mostraron un retraso evidente en la acumulación de FlhF. Esto dio lugar a células en etapas tardías del ciclo donde la proteína únicamente se localizó en uno de los extremos, dejando polos huérfanos (Fig. 48, triángulos azules). En algunos casos, este proceso llegó a retrasarse una generación completa provocando la aparición de células que, durante la división celular, presentaron focos únicamente en uno de sus polos y en el septo en formación. 2) Otro de los fenotipos habituales observados en el mutante $\Delta fimV$ fue la

aparición de focos deslocalizados de FlhF similares a los que se generan en el mutante $\Delta fleN$ (Fig. 44), aunque en muchos casos no presentaron una localización subpolar, sino que ocuparon posiciones más alejadas del polo (Fig. 48, triángulos blancos). 3) También se observaron polos en los que la acumulación de FlhF no se detuvo con el paso de las generaciones, dando lugar a células con una distribución muy asimétrica de la proteína entre sus dos extremos. Los polos que sobreacumulan FlhF llegaron a formar focos mucho mayores a los que se forman en la estirpe silvestre (Fig. 48, triángulos rojos).

La variedad de fenotipos descritos en el mutante $\Delta fimV$ sugiere que esta proteína participa en la correcta localización de FlhF, su aparición en ambos polos, así como en la dinámica de acumulación tras la división en *P. putida* KT2442.

3.10 La proteína ParC localiza en el polo celular y es necesaria para la correcta movilidad celular en *P. putida* KT2442

La familia de proteínas ParA constituye un grupo de proteínas con actividad ATPasa implicadas en la segregación del material genético entre las células hijas previo a la división celular (Fogel & Waldor, 2005; Ptacin *et al.*, 2010). De forma más reciente, se ha descrito el papel de alguno de sus integrantes en la segregación y el posicionamiento de ciertos elementos en los polos celulares (Thompson *et al.*, 2006). Este es el caso de la proteína ParC, encargada de reclutar los componentes del sistema de quimiotaxis en el polo celular en *V. cholerae* (Ringgaard *et al.*, 2011). En *P. putida*, la función de ParC (PP_4334) no ha sido caracterizada, aunque algunos datos como la alta homología estructural con la proteína descrita en *Vibrio*, su localización dentro del clúster flagelar y la dependencia del activador transcripcional FleQ (capítulo 2) sugieren que ambas proteínas podrían cumplir funciones similares.

Con objeto de iniciar la caracterización y determinar si ParC juega un papel en la movilidad de *P. putida*, se construyó un mutante de delección en fase del gen *parC* y se llevaron a cabo ensayos de movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Fig. 49). El ensayo demostró que la delección del gen *parC* redujo la capacidad de desplazarse mediante *swimming* un 54.1 ± 3.4 % ($n \geq 3$) respecto a la estirpe silvestre (Fig. 49 A), lo que refuerza la idea de que ParC en *P. putida* podría tener un papel similar al descrito previamente en *Vibrio* spp. (Ringgaard *et al.*, 2011). La movilidad en superficie tipo *swarming* también se vio afectada en ausencia de *parC*, sin embargo, el fenotipo observado fue claramente

distinguible del mutante $\Delta fleQ$ empleado como control no móvil, indicando que el mutante presenta cierta capacidad para desplazarse mediante *swarming* (Fig. 49 B).

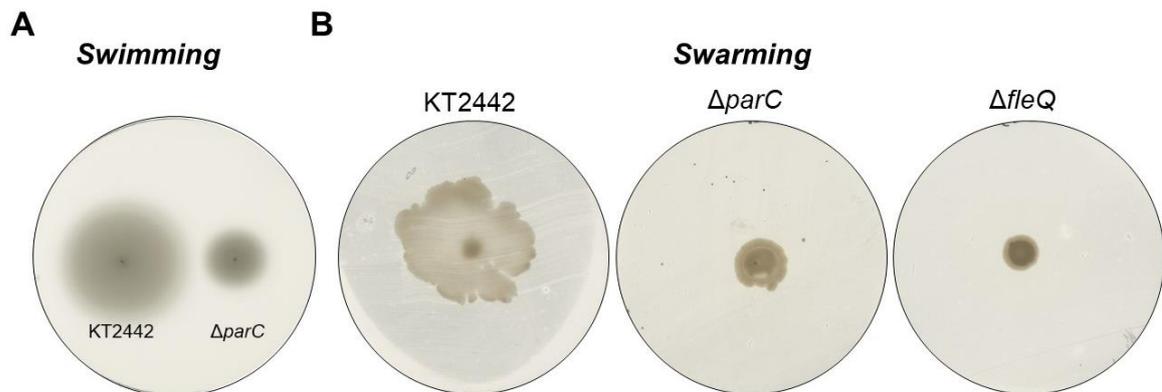


Figura 49. Efecto de la delección de *parC* sobre la movilidad tipo *swimming* y *swarming*. (A) ensayo de movilidad tipo *swimming* en agar semisólido (0.3%) mediante picadura ($n \geq 3$). (B) ensayo de movilidad tipo *swarming* ($n \geq 3$).

Una vez confirmado el efecto de la delección de *parC* sobre la movilidad en *P. putida*, nos preguntamos si ParC se asocia al polo celular y si esta asociación depende de alguno de los elementos que controlan la localización y el ensamblaje del sistema flagelar. Para comprobar la localización de ParC en la célula, se realizó un marcaje fluorescente de la proteína en su extremo N-terminal. Para ello, se amplificó la región codificante del gen *parC* (*pp4334*) y se clonó en el plásmido pMRB230, que contiene el transposón Tn7 y está diseñado para la expresión de proteínas fusionadas a la proteína fluorescente dTOMATO en su extremo N-terminal bajo el control de un promotor inducible por salicilato. El transposón contenido en la construcción resultante, denominada pMRB239, se integró en el genoma de la estirpe silvestre y de los fondos genéticos mutantes $\Delta fimV$, $\Delta fleN$ y $\Delta flhF$, y se observó posteriormente mediante microscopía confocal (Fig. 50).

En la estirpe silvestre *P. putida* KT2442, ParC formó focos, preferentemente en uno de los polos celulares y en ocasiones en ambos polos durante las etapas más tardías del ciclo celular. La localización polar de ParC no se vio alterada en los mutantes $\Delta flhF$ ni $\Delta fleN$, donde la localización fue indistinguible de la estirpe silvestre, lo que sugiere que ninguno de estos elementos participa en el reclutamiento de ParC en el polo celular, a diferencia de lo que ocurre durante la localización del aparato flagelar. Por el contrario, en el fondo mutante $\Delta fimV$, ParC perdió su localización polar y fue incapaz de formar focos concretos, ni siquiera de forma deslocalizada.

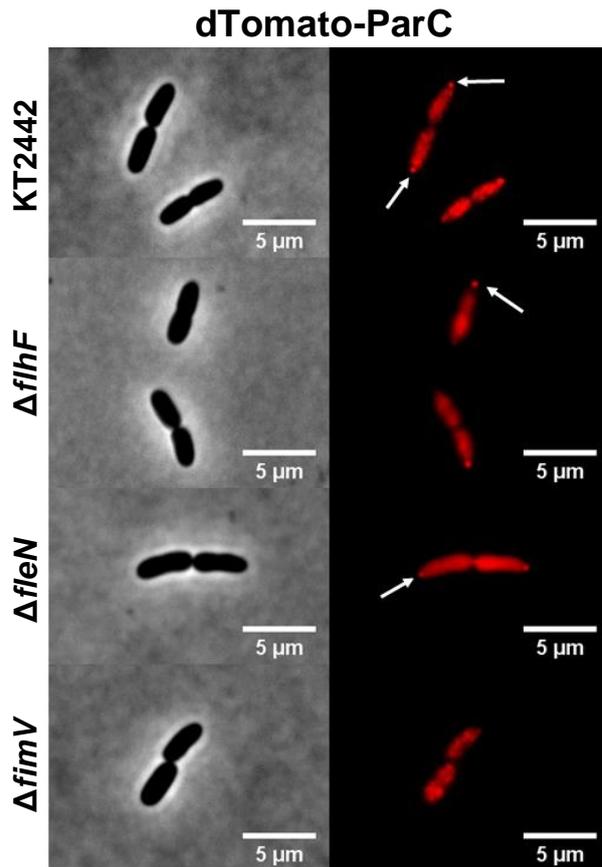


Figura 50. Localización de ParC en la estirpe silvestre KT2442 y los fondos mutantes $\Delta fimV$, $\Delta fleN$ y $\Delta flhF$. Imagen de microscopía de contraste de fase (columna izquierda) y de fluorescencia (columna derecha) de la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta flhF$, $\Delta fleN$ y $\Delta fimV$ expresando de forma heteróloga la proteína ParC fusionada a dTOMATO en su extremo N-terminal. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos polares de ParC. Medio con salicilato sódico 0.1 mM adicionado como inductor. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMi8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

3.11 ParC participa en la correcta localización de receptores del sistema de quimiotaxis en *P. putida* KT2442

P. putida KT2442 presenta 4 receptores, denominados Aer, que median la respuesta direccional de la célula a lo largo de los gradientes de oxígeno en el medio, proceso conocido como aerotaxis, así como la quimiotaxis hacia compuestos fenólicos. La proteína del sistema de quimiotaxis CheA se encarga de la correcta localización de estos receptores y otros componentes del sistema en el polo celular (Sarand *et al.*, 2008). Para comprobar si existen otros elementos, además de CheA, que afecten a la localización de los receptores Aer en *P. putida* KT2442, se transfirieron a la estirpe silvestre y a los fondos mutantes $\Delta parC$ y $\Delta fimV$ las construcciones previamente empleadas por Sarand y colaboradores (Sarand *et al.*, 2008) para la expresión de las proteínas Aer1 (pMRB233) y Aer2 (pMRB234) fusionadas a la proteína fluorescente eYFP bajo su propio promotor. Posteriormente, se comprobó su localización mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 51).

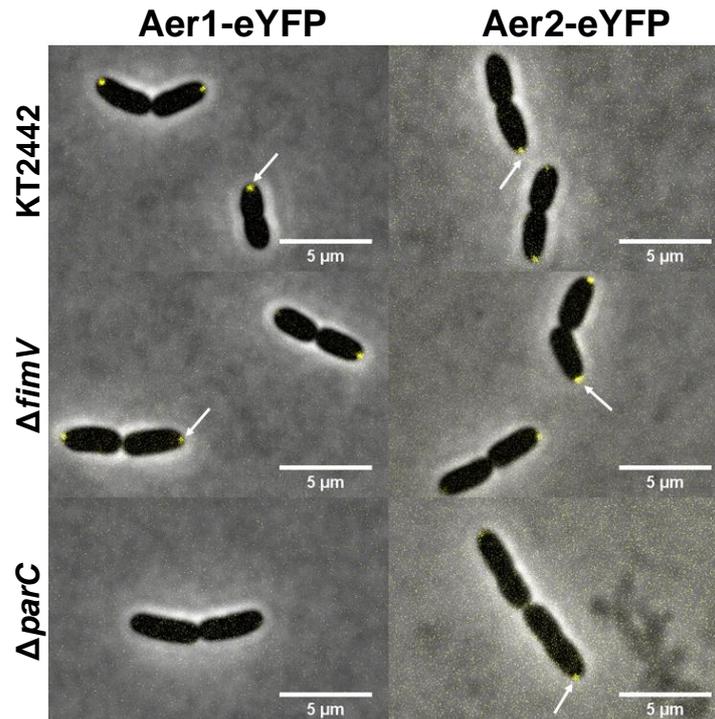


Figura 51. Localización del receptor Aer1 y Aer2 en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fimV$ y $\Delta parC$. Superposición de imágenes de microscopía de fluorescencia y de contraste de fase de la estirpe silvestre KT2442 y de los fondos mutantes $\Delta fimV$ y $\Delta parC$ expresando la proteína de fusión Aer1-YFP (izquierda) o Aer2-YFP (derecha) bajo su propio promotor. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos polares. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMi8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) y soporte de agarosa.

Como se observa, ambos receptores fueron capaces de formar focos en los polos celulares en la estirpe silvestre, en concordancia con la localización previamente descrita por Sarand y colaboradores (Sarand *et al.* 2008). Aunque la presencia de focos polares fue evidente en muchas de estas células, únicamente el 42 % (n=239) de ellas mostraron señal en al menos un polo en la estirpe silvestre para Aer1 (Fig. 51, izquierda). Esta cifra aumenta hasta el 64 % (n=223) en el caso de las células que presentaron Aer2 en alguno de sus polos (Fig. 51, derecha). La delección de *parC* tuvo efectos notables sobre la localización de ambas proteínas. En el caso de Aer1, la ausencia de ParC eliminó por completo la formación de focos en la célula (Fig. 51, izquierda), mientras que redujo de forma considerable la presencia de Aer2, pasando de aparecer en el 64 % de los polos en la estirpe silvestre al 22 % (n=231) en la estirpe $\Delta parC$, donde además se acumuló formando focos menos intensos (Fig. 51, derecha). FimV por su parte, no parece jugar un papel fundamental en la localización de estos receptores ya que, tras su delección, el número de células con capacidad para formar focos fue similar: 37 % (n=126) en el mutante frente al 42% en la estirpe silvestre para Aer1 (Fig. 51, izquierda) y 62 % (n=115)

frente a 64% para Aer2 (Fig. 51, derecha). Los datos se representan agrupados en forma de gráfica en la figura 52.

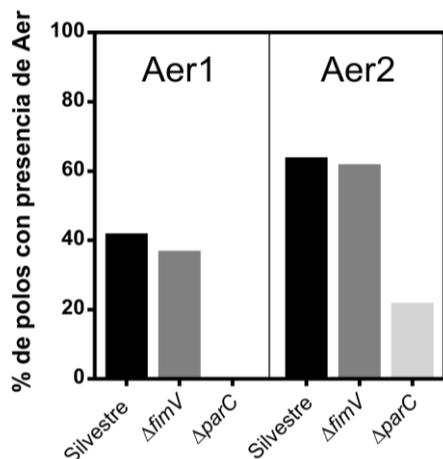


Figura 52. Efecto de la delección de *fimV* y *parC* sobre la localización de los receptores de quimiotaxis Aer1 y Aer2. Se representa el porcentaje de polos en los que se identificó la presencia de los receptores Aer1 o Aer2 en la estirpe silvestre y los fondos mutantes $\Delta fimV$ y $\Delta parC$. $n \geq 115$ en todos los casos.

Estos resultados respaldan el papel de ParC como una de las proteínas encargadas de localizar elementos del sistema de quimiotaxis en el polo celular en *P. putida* KT2442. Sin embargo, con la información disponible hasta el momento no es posible concluir si el efecto de la delección de *parC* sobre la localización de los receptores Aer es indirecto y se encuentra mediado por CheA o si por el contrario ocurre de forma directa. Por su parte, la ausencia de FimV no tuvo ningún efecto sobre la localización de los receptores Aer a pesar de que ParC pierde su localización polar en este mutante (Fig. 52). Estos resultados sugieren que es la función y no la localización de ParC la que hace posible la correcta localización de los receptores.

3.12 ParC altera la movilidad celular sin modificar la localización polar de FliN, FliH o FimV

Una vez comprobado el efecto de ParC sobre la localización de receptores del sistema de quimiotaxis en el polo celular, se optó por estudiar si esta proteína juega algún papel en la localización de otras proteínas polares como FliN, FliH o FimV. Para ello, se integraron los transposones contenidos en las construcciones que expresan las proteínas FliN-GFPmut3 (pMRB198), FliH-GFPmut3 (pMRB197) y FimV-GFPmut3 (pMRB236) en el genoma de la estirpe mutante $\Delta parC$, y se comprobó su localización mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 53).

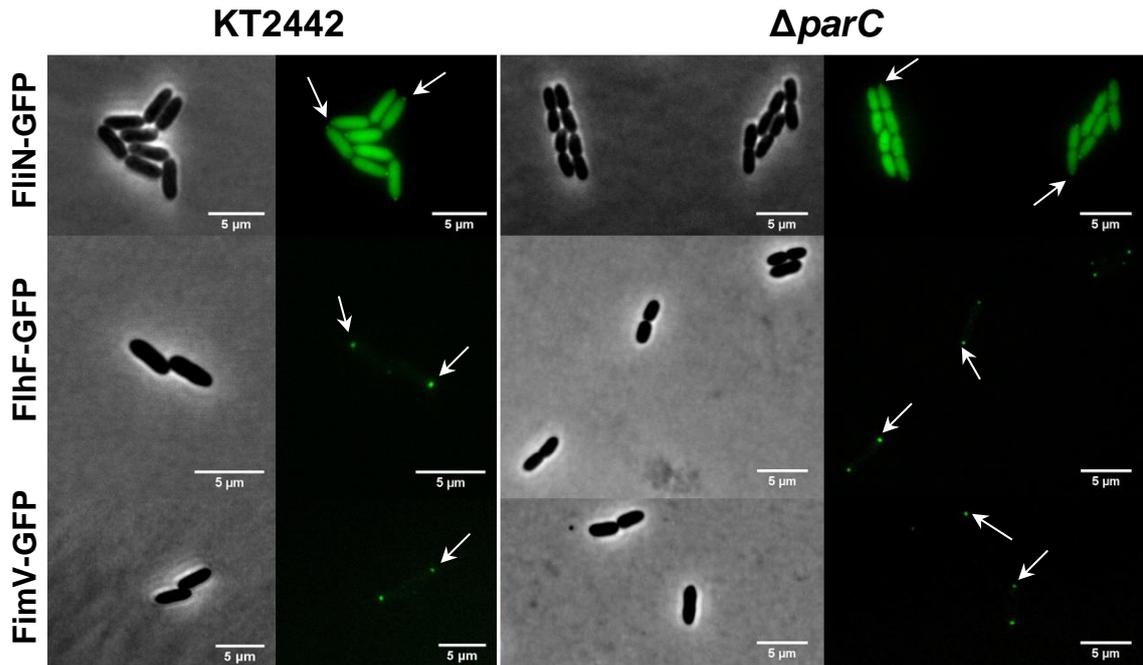


Figura 53. Localización de las proteínas FliN, FlhF y FimV en la estirpe silvestre y el fondo mutante $\Delta parC$. Imagen de microscopía de contraste de fase (columna izquierda en cada caso) y de fluorescencia (columna derecha en cada caso) de las proteínas FliN (fila superior), FlhF (fila central) y FimV (fila inferior) en la estirpe silvestre y el fondo mutante $\Delta parC$. Las flechas de color blanco indican algunos de los focos polares. La expresión de las proteínas FliN y FlhF se indujo mediante la adición de salicilato sódico 0.1 mM. En el caso de la proteína FimV no se adicionó inductor. Imágenes tomadas con un microscopio Leica DMi8 invertido (objetivo 100X con aceite de inmersión) sobre soporte de agarosa.

La ausencia de ParC no modificó ni la localización ni la distribución de ninguna de las proteínas estudiadas (Fig. 53), lo que indica que los defectos en la capacidad de *swimming* que presenta el mutante $\Delta parC$ (Fig. 49) no están generados de forma indirecta por la modificación en la localización de estos componentes, sin embargo, estos resultados no permiten descartar que ParC module la actividad de alguna de ellas.

3.13 Los mutantes $\Delta parC$, $\Delta fimV$ y $\Delta flhF$ presentan defectos en la capacidad de quimiotaxis

Con objeto de confirmar la capacidad que mantienen los diferentes mutantes estudiados para detectar quimioatrayentes en el medio, se llevó a cabo un ensayo de quimiotaxis mediante disco de agarosa empleando casaminoácidos 0,2% (p/v) (Fig. 54) como quimioatrayente. Los casaminoácidos están constituidos por una mezcla de aminoácidos para los que se ha descrito una fuerte respuesta quimiotáctica en diversas especies de *Pseudomonas* (Oku *et al.*, 2012; Sampedro *et al.*, 2015). Como control

negativo del ensayo se emplearon discos de agarosa sin quimioatrayente. La estirpe aflagelada $\Delta clusterflagelar$ que no incluye ninguno de los genes necesarios para la síntesis del flagelo o el sistema de quimiotaxis, fue empleada como control negativo de quimiotaxis. A diferencia de los ensayos de *swimming* y *swarming*, este ensayo es independiente de la tasa de crecimiento de cada uno de los mutantes.

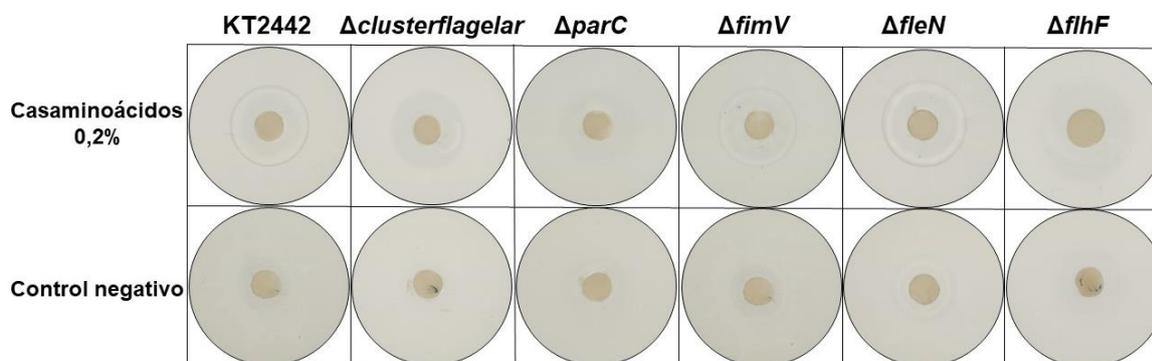


Figura 54. Respuesta quimiotáctica de la estirpe silvestre y los diferentes mutantes estudiados. Ensayo de quimiotaxis mediante disco de agarosa con casaminoácidos 0,2 % como sustancia quimioatrayente (fila superior). En el control negativo se empleó un disco de agarosa sin quimioatrayente. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y en estático durante 4 horas antes de tomar la fotografía para favorecer la aparición de los halos de concentración (n=2).

La estirpe silvestre fue capaz de formar un halo de células alrededor del disco de agarosa a medida que el quimioatrayente contenido en él difundió al medio, formando lo que se conoce como halo de concentración (Fig. 54). El análisis de quimiotaxis reveló que los mutantes $\Delta parC$ y $\Delta flhF$ no fueron capaces de generar estos halos, indicando que presentan afectada su capacidad para detectar el quimioatrayente en el medio. Este ensayo no permite discernir si el defecto se debe estrictamente a un problema en la maquinaria de quimiotaxis o asociado a los defectos en la movilidad que presentan estos mutantes (Fig. 33 y 49). Sin embargo, las placas se monitorizaron durante al menos 12 horas sin obtener variación alguna en los resultados, sugiriendo que los problemas se deben a la capacidad de detección del compuesto y no a una movilidad reducida. El mutante $\Delta fleN$ formó un halo de concentración muy similar al de la estirpe silvestre a pesar de presentar defectos de movilidad en el resto de los ensayos dependientes de flagelo (*swimming* y *swarming*) (Fig. 33). Finalmente, el mutante $\Delta fimV$ formó un halo de concentración más tenue que la estirpe silvestre, lo que podría relacionarse con un defecto en la detección de compuestos en el medio. En cualquier caso, el mutante $\Delta fimV$ mantuvo cierta capacidad de quimiotaxis mientras que en los fondos mutantes $\Delta parC$, $\Delta flhF$ o $\Delta clusterflagelar$ el defecto fue absoluto.

Discusión

1. Factores implicados en la expresión de los genes relacionados con la formación del biofilm

A lo largo de esta tesis doctoral se ha estudiado la regulación transcripcional ejercida sobre los promotores que controlan la expresión de algunos de los genes relevantes para la formación de biofilm en *P. putida* KT2442: *PlapA*, responsable de la expresión de la adhesina de superficie LapA, y *Pbcs*, encargado de la transcripción de los genes que codifican el complejo celulosa sintasa.

1.1 Regulación del promotor *PlapA*

En el caso de la región promotora *PlapA*, que contiene varios promotores dependientes de σ^{70} , FleQ actúa como activador necesario para la transcripción (Fig. 12). Usando la secuencia consenso de unión de FleQ descrita para promotores relacionados con la formación de biofilm en *P. aeruginosa* (Baraquet & Harwood, 2016) fue posible reconocer hasta 3 posibles sitios de unión de FleQ en esta región (Fig. 14), localizándose dos de ellos aguas abajo de los 6 promotores funcionales previamente descritos (Ainelo *et al.*, 2017). Este fenómeno es infrecuente dado que las proteínas reguladoras del tipo bEBPs, como FleQ, raramente activan promotores dependientes de σ^{70} como los descritos en la región promotora *PlapA*. Además, los sitios de activación reconocidos en los promotores activados por bEBPs no acostumbran a localizarse aguas abajo del promotor, sino más bien en regiones distales (UAS) localizadas aguas arriba (Bush & Dixon, 2012). A pesar de ello, se han descrito algunos ejemplos de promotores dependientes de σ^{70} activados de forma similar. Es el caso del regulador de virulencia Rns en estirpes enterotoxigénicas de *E. coli*, que activa su propia expresión uniéndose a sitios localizados aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (Munson & Scott, 2000) o, más relacionado con este trabajo, la activación del promotor *PcdrA* mediada por FleQ en *P. aeruginosa*, donde 2 de los 3 sitios de interacción identificados se encuentran localizados aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (Baraquet & Harwood, 2016). No obstante, los mecanismos que hacen posible la activación de estos promotores mediante el reconocimiento de sitios localizados aguas abajo del promotor son en su mayoría desconocidos.

El activador FleQ presenta un dominio regulador REC en su extremo N-terminal, aunque su actividad no está regulada mediante la fosforilación de un residuo de ácido aspártico conservado en esta región, como ocurre frecuentemente en los reguladores que incorporan este dominio (Gao & Stock, 2010). En su lugar, la actividad de FleQ se

Discusión

encuentra modulada por dos elementos: la proteína FleN y los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc. FleN ha sido ampliamente descrita como antagonista de la activación transcripcional mediada por FleQ en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2000; Dasgupta & Ramphal, 2001) y se ha constatado mediante estudios cristalográficos que FleN en su forma dimérica interacciona con FleQ e inhibe su actividad ATPasa (Chanchal *et al.*, 2017). Nuestros resultados muestran que la expresión de *PlapA* aumenta en el fondo mutante $\Delta fleN$ en las condiciones de ensayo empleadas (Fig. 12), indicando que FleN antagoniza la activación mediada por FleQ sobre el promotor *PlapA* también en *P. putida* KT2442. A pesar de que, tanto en presencia como en ausencia de FleN, la expresión del promotor *PlapA* depende estrictamente de FleQ, no se detectaron complejos FleQ-ADN en ensayos de retardo en gel en ninguno de los fragmentos de *PlapA* empleados (Fig. 15 C y D). No obstante, estudios realizados por otros grupos usando una sonda similar a la sonda *PlapA_2* empleada en nuestros ensayos mostraron que FleQ, por sí solo, es capaz de formar complejos inestables *in vitro* (Baraquet *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2017). La incorporación de FleN a las mezclas de reacción de ensayos *in vitro* dio lugar a la formación de complejos estables y definidos en los dos fragmentos de *PlapA* ensayados (Fig. 15 C y D), indicando que la presencia de FleN aumenta la afinidad de FleQ por la región promotora *PlapA*. Estos resultados concuerdan son coherentes con los publicados por otros grupos en promotores relacionados con la formación de biofilm en *P. putida* y *P. aeruginosa* (Baraquet & Harwood, 2016; Nie *et al.*, 2017).

El papel del di-GMPc como modulador de la actividad de diferentes bEBP ha sido descrito en organismos como *P. aeruginosa* o *V. cholerae* (Baraquet & Harwood, 2013; Srivastava *et al.*, 2013). De acuerdo con nuestros resultados, el incremento artificial de los niveles de di-GMPc aumenta la expresión de *PlapA* respecto a una estirpe que mantiene niveles bajos de di-GMPc (Fig. 13 A). Este aumento en la expresión únicamente se detecta en presencia de FleQ, indicando que es esta proteína la responsable de modificar la expresión en función de los niveles de di-GMPc.

Por su parte, la proteína reguladora FleN se encarga de modular la sensibilidad de FleQ a los niveles de di-GMPc. La presencia de FleQ y FleN hace posible la formación de un complejo estable con *PlapA* *in vitro* (Fig. 15 C y D), sin embargo, los resultados de expresión *in vivo* muestran que la capacidad de activación de este complejo es únicamente parcial en ausencia de di-GMPc (Fig. 13 A). El aumento en los niveles de di-GMPc promueve un aumento de afinidad de FleQ o del complejo FleQ-FleN por la región promotora que lleva asociado un incremento en los niveles de transcripción observados *in vivo* (Fig. 13 A).

Cuando FleN se encuentra ausente, FleQ interacciona con la región promotora de forma inestable, aunque con capacidad para activar la transcripción *in vivo* (Fig. 13 A). En estas condiciones, la respuesta de FleQ a los cambios en concentración de di-GMPc intracelular se invierte respecto a la observada en la estirpe silvestre, y el di-GMPc pasa a antagonizar la activación del promotor *P_{lapA}* (Fig. 13 A).

Los datos obtenidos en conjunto con los resultados previamente publicados sugieren que: (1) FleQ se une a la región promotora *P_{lapA}* y activa parcialmente su expresión sin necesidad de FleN (Fig. 55 A). (2) Esta activación se inhibe parcialmente en presencia de di-GMPc (Fig. 55 B). (3) En presencia de FleN, FleQ se une con mayor afinidad a la región promotora *P_{lapA}*, aunque con una capacidad de activación limitada (Fig. 55 C). (4) En esta nueva configuración, la presencia de di-GMPc estimula la activación (Fig. 55 D).

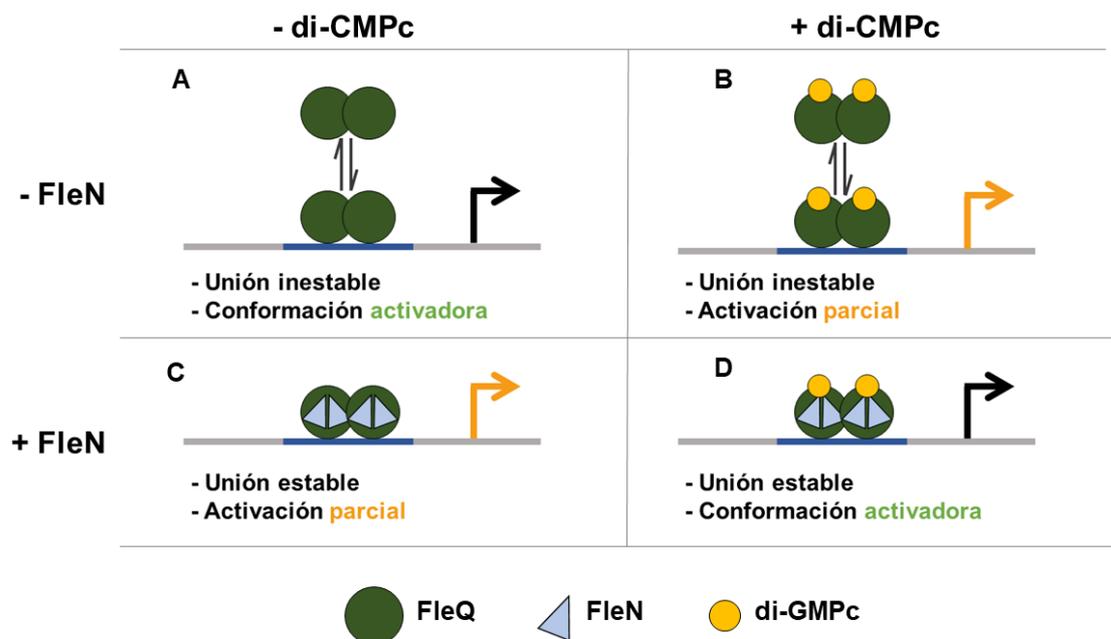


Figura 55. Modelo de regulación del promotor *P_{lapA}*

El análisis y la interpretación de los datos obtenidos acerca de la regulación de la expresión de *lapA* resultan complejos dada la presencia de un número inusualmente alto de promotores funcionales, así como la participación de reguladores adicionales como Fis (Ainelo *et al.*, 2017) que no se han considerado en este trabajo. El modelo propuesto ofrece un marco de referencia, sin embargo, son necesarios estudios adicionales para completar la caracterización de la regulación del promotor *P_{lapA}* en detalle.

1.2 Regulación del promotor *P_{bcs}*

Al contrario de lo que ocurre en *P_{lapA}*, FleQ actúa como represor en la regulación del promotor *P_{bcs}* (Fig. 12). Los sitios de unión de FleQ identificados en esta región promotora mediante el análisis de la secuencia se encuentran distanciados entre sí 40 pb y el más próximo al gen *bcs* solapa con la región -35 del promotor σ^{70} propuesto (Fig. 14). La unión de FleQ en este punto podría competir con la unión de la ARN polimerasa al promotor. Además, es probable que la presencia de sitios de unión de FleQ próximos permita la interacción entre las moléculas de FleQ unidas a cada uno de los sitios dando lugar a un plegamiento o lazo represor, similar al propuesto en otras regiones promotoras como la de *P_{pel}* de *P. aeruginosa* (Baraquet *et al.*, 2012). Como ocurre en el caso de *P_{lapA}*, la presencia de FleQ, sin FleN, no es suficiente para formar complejos estables *in vitro* (Fig.15 B) (Nie *et al.*, 2017). Este fenómeno concuerda con los resultados obtenidos *in vivo*, donde el mutante $\Delta fleN$ muestra niveles de expresión superiores a la estirpe silvestre e indistinguibles de los obtenidos en la estirpe que carece de FleQ (Fig.13 B), indicando que el promotor no se encuentra reprimido en ausencia de FleN. Por el contrario, la interacción de FleQ con la región promotora *P_{bcs}* en presencia de FleN da lugar a complejos de interacción estables y definidos en los ensayos *in vitro* (Fig. 15 B). En esta situación, FleQ se mantendría unido, bloqueando el promotor y reprimiendo la expresión, lo que encaja con los menores niveles de expresión obtenidos al reducir la concentración de di-GMPc artificialmente (Fig. 13 B). Por el contrario, cuando los niveles de di-GMPc se incrementan, el complejo FleQ-ADN o FleQ-FleN-ADN deja de bloquear la región promotora (Fig. 15 B) y la expresión de *P_{bcs}* aumenta (Fig. 13 B). El mecanismo que regula los niveles de expresión de *P_{bcs}* por medio de FleQ, FleN y el di-GMPc se muestra representado en la figura 56.

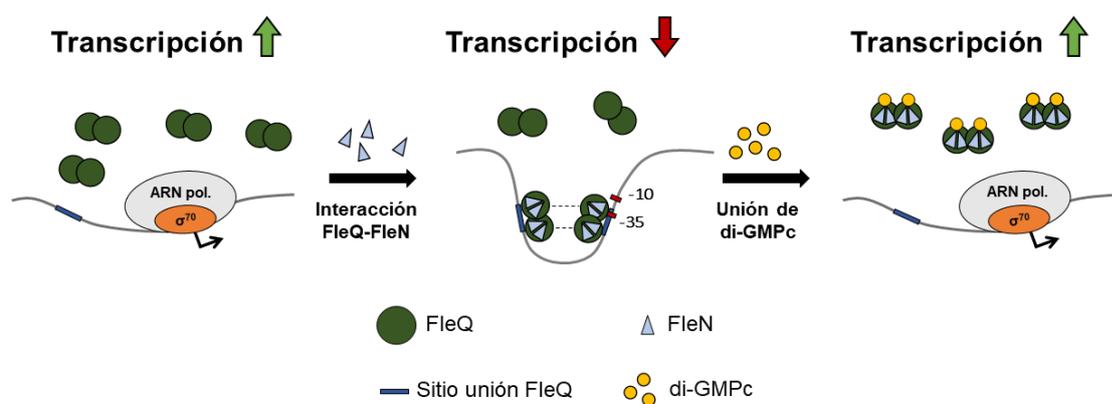


Figura 56. Modelo de regulación del promotor *P_{bcs}*.

1.3 Coordinación de la respuesta durante la formación de biofilm

A pesar de que tanto la adhesina LapA como la celulosa son necesarios para la formación y el mantenimiento de la estructura del biofilm en *P. putida*, los mecanismos que se encargan de regular su síntesis son completamente diferentes, por lo que la expresión simultánea de ambos promotores durante la formación del biofilm requiere de una respuesta diferencial. Esta es posible gracias al papel de la proteína reguladora FleN, que modula la actividad de FleQ de manera antagónica o sinérgica dependiendo del promotor, lo que implica un comportamiento dual no descrito hasta la fecha. La actividad de FleQ y FleN junto con los niveles de di-GMPc determinan el estilo de vida escogido por la bacteria. Un modelo para la respuesta coordinada de estos elementos se representa de forma esquemática en la figura 57.

Durante la etapa planctónica del ciclo de vida, los niveles de di-GMPc son bajos en la célula. En estas condiciones, FleQ se mantiene unido a *Pbcs* impidiendo la acción de la polimerasa y reprimiendo parcialmente su expresión. Por su parte, en la región promotora *PlapA*, FleQ se mantiene unido de forma estable, aunque en una conformación incapaz de activar la expresión. Como resultado, los genes relacionados con biofilm se encuentran expresados a menor nivel en esta etapa. Diferentes factores ambientales disparan la producción de di-GMPc que, al aumentar su concentración intracelular, promueve la formación de biofilm. En estas condiciones, las moléculas de di-GMPc interaccionan con FleQ y disocian el complejo represor que bloquea el promotor *Pbcs*, ya sea por medio de la disociación del complejo FleQ-FleN o bien por un cambio en la afinidad del complejo por el promotor, aumentando en consecuencia los niveles de expresión. En la región promotora *PlapA*, la interacción entre FleQ y el di-GMPc aumenta la afinidad del regulador por sus sitios de unión y promueve un cambio hacia una conformación competente para la activación. De esta forma, en las condiciones que fisiológicamente son relevantes para la formación del biofilm, la adhesina LapA y el complejo de la celulosa sintasa se estarían expresando simultáneamente.

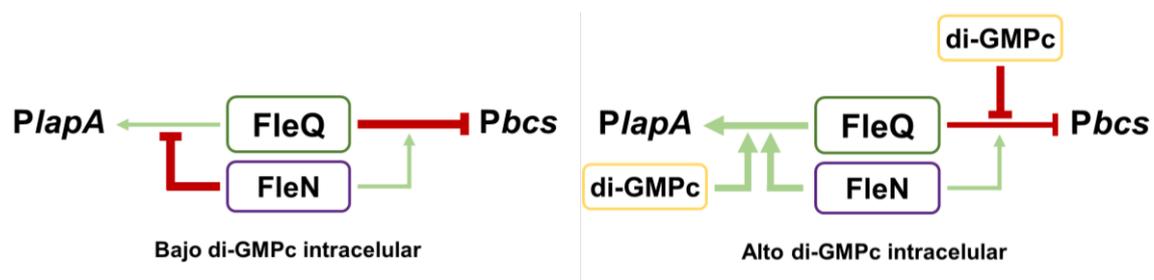


Figura 57. Modelo de regulación por FleQ y FleN de los genes relacionados con el biofilm en condiciones de alto y bajo di-GMPc. Las flechas verdes indican efecto positivo o activación. Las líneas rojas

indican efecto negativo o represión. El grosor de las líneas hace referencia al efecto predominante en cada uno de los regímenes de di-GMPc ensayados.

2. Factores implicados en la expresión de los genes relacionados con la formación de flagelo

La formación de biofilm y la síntesis flagelar comparten gran parte de los factores que se encargan de regular de manera inversa ambos procesos y asegurar la elección exclusiva de uno de los estilos de vida. A diferencia de la formación de biofilm, la biosíntesis del flagelo y el sistema de quimiotaxis asociado en *P. putida* KT2442 implica la participación de numerosos genes agrupados mayoritariamente en operones y localizados en una región concreta del genoma. La regulación a diferentes niveles de este grupo de genes supone un desafío logístico para la bacteria que requiere de una regulación precisa y estricta de su expresión. Los primeros estudios relacionados con la expresión de genes flagelares describen procesos de activación en cascada que permiten la transcripción ordenada y secuencial de los diferentes elementos necesarios durante el ensamblaje del flagelo (Arora *et al.*, 1997). Este modelo se ha demostrado como el más frecuente. En *P. putida* KT2442, dada la falta de estudios específicos, en la mayoría de los casos se asume el modelo descrito en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003). *P. putida* presenta todos los elementos reguladores descritos en la cascada de regulación de *P. aeruginosa* (FleQ, FleN, FleR, FliA y σ^{54}) (Dasgupta *et al.*, 2003); sin embargo, los diferentes patrones de flagelación, así como las diferencias fisiológicas y ambientales entre ambas especies sugieren diferencias en los mecanismos reguladores que dirigen el proceso. A lo largo de este estudio se ha abordado la regulación de 23 promotores relacionados con la síntesis y el ensamblaje flagelar en *P. putida* KT2442.

2.1 Regulación de la expresión del activador transcripcional FleQ (Clase I)

El trabajo presentado en esta tesis ha permitido determinar que la expresión de FleQ, el regulador principal de la cascada flagelar, no se encuentra regulada ni por sí mismo ni por otros elementos reguladores implicados en la síntesis flagelar como FleN o FleR (Fig. 17). Tampoco se ha observado regulación mediada por AlgZ, descrito previamente como represor de la transcripción de *fleQ* en *P. aeruginosa* (Tart *et al.*, 2006). La presencia en la secuencia del promotor *P_{fleQ}* de dos posibles regiones -35 y -10 (anexo II) sugiere que los bajos niveles de expresión que mantiene este promotor (Fig. 17) están mediados por el factor σ^{70} . Además, la inhibición del crecimiento observada al expresar FleQ de forma ectópica a niveles elevados sugiere que la expresión de *fleQ* debe

mantenerse a un nivel bajo en la célula. Estos resultados difieren de los previamente descritos en *P. aeruginosa*, donde la sobreexpresión de FleQ no tiene efectos notables sobre el crecimiento (Jain & Kazmierczak, 2014). Aunque no es posible confirmarlo con los experimentos realizados hasta el momento, es probable que, en *P. putida*, la regulación de la síntesis del flagelo se lleve a cabo principalmente mediante el control de la expresión de genes cuyos productos están implicados en etapas posteriores del proceso de biosíntesis, y no sobre el regulador principal. Este modelo diferenciaría a *P. putida* de otras bacterias flageladas como *E. coli* o *Brucella melitensis*, donde gran parte de la regulación es ejercida a través del control transcripcional de los reguladores principales FlhDC y FtcR respectivamente (Smith & Hoover, 2009; Léonard *et al.*, 2007)

2.2 Regulación de los genes del clúster flagelar activados por FleQ (Clase II)

Se ha estudiado la expresión de 23 promotores relacionados con la síntesis flagelar, incluyendo aquellos descritos en nuestro propio grupo (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016; Navarrete *et al.*, 2019) y los identificados mediante la evidencia experimental descrita en la literatura (Nelson *et al.*, 2002; Blanco-Romero *et al.*, 2018). El análisis de la expresión de estos promotores en los fondos mutantes $\Delta fleQ$ y $\Delta rpoN$ sugiere que todos los promotores flagelares estudiados dependen de estos factores y pone de manifiesto el papel de FleQ y el factor σ^{54} (RpoN) como los elementos reguladores principales de la cascada de transcripción (Fig. 18). El análisis pormenorizado permitió determinar que, en 13 de ellos, la transcripción depende directamente del activador FleQ (Fig. 20), identificándose en todos ellos secuencias que cumplen el consenso descrito para la unión del factor σ^{54} (Barrios *et al.*, 1999) (anexo II). Esto supone un número notablemente mayor que los 7 promotores previamente descritos como dependientes de FleQ en la cascada reguladora de la síntesis del flagelo en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003). La activación de algunos de estos promotores flagelares por medio de FleQ y del factor σ^{54} había sido previamente descrita en nuestro laboratorio (Jiménez-Fernández *et al.*, 2016) e igualmente representa un fenómeno habitual en otras cascadas flagelares como la descrita en *V. cholerae* o *C. crescentus* (Prouty *et al.*, 2001; Brun & Shapiro, 1992).

En la regulación de la transcripción de los genes flagelares, el papel de la proteína FleN es homogéneo, actuando como antagonista de la activación mediada por FleQ en todos los casos excepto en *PflgZ*, donde no se observaron diferencias significativas de expresión (Fig. 21). La delección de *fleN* provoca un aumento de entre 3 y 5 veces en la expresión respecto a la estirpe silvestre, sugiriendo que la interacción FleQ-FleN causa

Discusión

un efecto similar sobre la expresión de todos los promotores estudiados. Así, los resultados obtenidos encajan con el modelo previamente descrito en *P. aeruginosa*, donde la unión de FleN provoca un cambio estructural en FleQ que inhibe la actividad ATPasa e impide la activación de promotores σ^{54} , que requiere necesariamente del aporte energético generado por la hidrólisis de ATP (Joly *et al.*, 2012; Chanchal *et al.*, 2017).

Entre los promotores regulados de forma directa por FleQ en *P. putida* KT2442 se encuentran *PflhA* y *PflhF* (Fig. 20), que se encargan de dirigir la expresión del operón que incluye a *fleN*. La presencia de *fleN* en un operón regulado de forma directa por FleQ implica que los niveles de FleN en la célula se mantienen autorregulados y, por ende, también se mantienen regulados los niveles del resto de componentes flagelares cuyos genes se encuentran activados por FleQ. La expresión no regulada de *fleQ* (Fig. 17) junto con la autorregulación observada en el caso de *fleN* (Fig. 21) daría lugar a un sistema tamponado que podría explicar la formación del patrón de flagelación observado. La fusión transcripcional al promotor *PflhF* mantiene además niveles relativamente altos de expresión independientes de FleQ (Fig. 18), lo que sugiere la presencia de un promotor dependiente de σ^{70} en esta región, tal y como propusieron Panzda y colaboradores (Panzda *et al.*, 2000). Un esquema de la regulación propuesta para el operón que incluye a *flhF*, *fleN* y *fliA* se muestra en la figura 58.

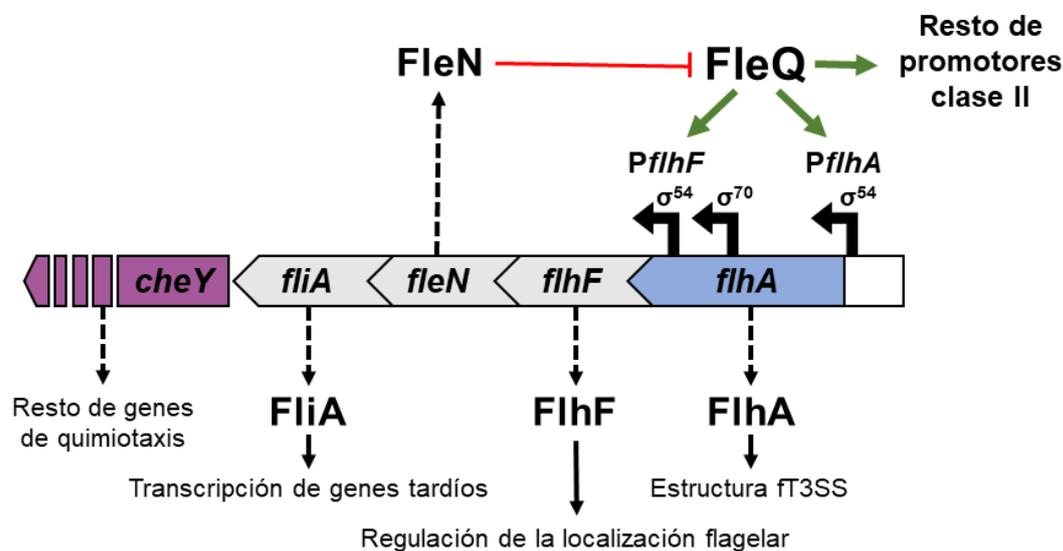


Figura 58. Regulación mediante retroalimentación negativa de los genes reguladores *flhF*, *fleN* y *fliA*. Las líneas de color verde señalan activación. Las líneas rojas indican modulación negativa. La expresión génica se representa mediante líneas discontinuas. Por simplificación, se omiten los 9 genes que constituyen el operón aguas abajo de *cheY*. En color azul se muestran los genes con función estructural, en gris los que presentan función reguladora y en violeta los genes relacionados con quimiotaxis.

En el grupo de promotores regulados de forma directa por FleQ también encontramos el promotor *PfleSR*, que se encarga de la expresión del sistema de dos componentes FleSR. FleR, el regulador de respuesta, ha sido descrito como un activador transcripcional de promotores σ^{54} , similar a FleQ y cuya participación en la cascada reguladora se sitúa habitualmente en las etapas intermedias (Dasgupta *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos confirman que FleR tiene un papel accesorio en la cascada de *P. putida* KT2442 (Fig. 23 y 24). A pesar de que este activador participa en la transcripción de 7 de los promotores directamente regulados por FleQ (*PfliL*, *PfliD*, *PparC*, *PfliH*, *PflgB*, *PflgF* y *PfleS*) (Fig. 23), su presencia no es indispensable en ninguna de las etapas de la cascada flagelar. El funcionamiento de la quinasa sensora FleS, necesaria para la fosforilación y activación de FleR, es prácticamente desconocido hasta la fecha, por lo que no es posible descartar que la activación del sistema se produzca únicamente en determinadas condiciones que por el momento no han sido identificadas. No obstante, la capacidad para desplazarse mediante *swimming* del mutante $\Delta fleR$ en *P. putida* (Fig. 24), indistinguible de la estirpe silvestre, sugiere que existen diferencias relevantes en la función que desempeña esta proteína en la cascada de *P. aeruginosa*, donde el mutante equivalente es completamente inmóvil (Ritchings *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos sugieren que la cascada de regulación de la síntesis del flagelo en *P. putida* ha evolucionado hacia una simplificación del sistema, dando lugar a una cascada en 3 etapas similar a la descrita en enterobacterias como *E. coli* o *Salmonella* spp. (Smith & Hoover, 2009), eliminando así una posible redundancia reguladora. Un modelo muy similar ha sido descrito recientemente en *Shewanella oneidensis* donde los activadores intermediarios FlrBC juegan un papel accesorio en la cascada y no son imprescindibles para la síntesis flagelar (Gao *et al.*, 2018).

En el caso del di-GMPc, el efecto sobre la expresión de los genes flagelares cuya expresión depende directamente de FleQ fue homogéneo, observándose un aumento de la expresión cuando los niveles de di-GMPc intracelular se mantuvieron bajos (Fig. 12). Según el modelo de interacción descrito en la bibliografía, un dímero de di-GMPc interacciona con FleQ a través de un sitio de unión complejo formado por residuos pertenecientes al dominio REC y el dominio AAA+, provocando una reorganización de la estructura cuaternaria de la proteína y una inhibición alostérica de la actividad ATPasa, fundamental en la activación de promotores dependientes de σ^{54} (Matsuyama *et al.*, 2016). Un mecanismo similar ha sido descrito en FlrA, ortólogo de FleQ en *V. cholerae* (Srivastava *et al.*, 2013), por lo que, a pesar de que no es posible descartar una regulación indirecta, es probable que el mecanismo sea similar en *P. putida*.

2.3 Genes del clúster flagelar regulados por FliA (clase III)

De forma similar a lo descrito en especies como *V.cholerae* o *S. oneidensis* (Prouty *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2018), entre los genes cuya expresión depende de FliA en *P. putida* se encuentran aquellos con un papel relevante en las últimas etapas del ensamblaje y en la propia regulación de la síntesis flagelar. Es el caso del factor anti- σ FlgM, inhibidor de la actividad del factor σ FliA. En este caso, el par FleQ-FleN se encarga de mantener los niveles de expresión de FliA (Fig. 58) mientras que FliA, a su vez, hace posible la expresión de FlgM (Fig. 25), lo que sugiere la existencia de un nivel adicional de regulación en las últimas etapas de la cascada flagelar. La presencia de este mecanismo regulador adicional ha sido descrita en otras especies con flagelación lofotrica como *P. syringae* pv tomato, monotrica como *Legionella pneumophila* o peritrica como *S. typhimurium* (Nogales *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2012; Kutsukake & Iino, 1994), por lo que no puede relacionarse con la generación de un patrón de flagelación concreto.

Los resultados en su conjunto indican que ninguno de los 23 promotores flagelares estudiados se encuentra regulado simultáneamente por FleQ y FliA, a diferencia de lo que ocurre en otras cascadas de transcripción, como la descrita en *E. coli* o *S. enterica*, donde se identifican promotores dependientes de σ^{70} activados por el regulador principal FlhDC y promotores dependientes de FliA en una única región reguladora (Ikebe *et al.*, 1999; Frye *et al.*, 2006). No obstante, en *P. putida* sí se han descrito fenómenos de transcripción *readthrough* entre operones regulados por promotores de diferente tipo. Es el caso del promotor *PflgA*, cuya expresión afecta a la transcripción del operón adyacente *flgMNZ* (Wirebrand *et al.*, 2018) o la transcripción procedente de los promotores *PflhA* y *PflhF*, que incluye hasta 10 genes localizados aguas abajo de *fliA* (Navarrete *et al.*, 2019).

Con los resultados obtenidos, es posible describir un modelo de cascada de expresión de los genes flagelares que los agrupa en 3 clases (Fig. 59). *fleQ*, dependiente de σ^{70} , es el único gen representante de la clase I, a diferencia de lo descrito en *P. aeruginosa*, donde *fliA* también se incluye en este grupo. Los genes de clase II, cuya expresión está directamente activada por FleQ y σ^{54} y modulada negativamente por FleN y el diGMPc, representan el grupo más amplio y, en este caso, incluye aquellos genes previamente descritos como dependientes de FleR en *P. aeruginosa* y a *fliA*. Los promotores de los genes de clase III dependen del factor σ flagelar FliA para su expresión y codifican elementos de las estructuras más distales del sistema flagelar y proteínas asociadas al sistema de quimiotaxis.

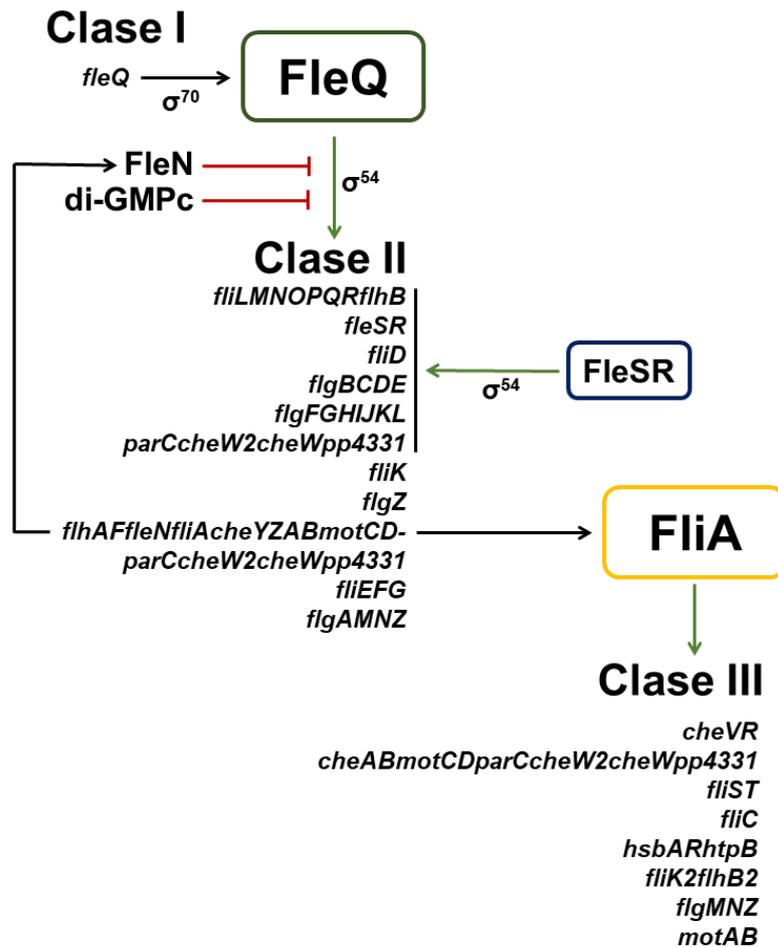


Figura 59. Modelo de la cascada de activación flagelar en *P. putida* KT2442. Las líneas negras indican expresión, las verdes activación, mientras que las rojas indican modulación negativa.

2.4 Regulación del promotor *P flgB*

Los experimentos realizados a lo largo de este trabajo han permitido caracterizar el mecanismo de activación del promotor *P flgB* por medio de FleQ. Este promotor regula la expresión del operón *flgBCDE*, que codifica proteínas encargadas de la etapa intermedia del ensamblaje y las primeras estructuras extracelulares, incluyendo la parte proximal de la barra, el gancho, así como la proteína de andamiaje FlgD, igualmente imprescindible para el ensamblaje de esta estructura. Mediante análisis de deleciones seriadas y mutagénesis dirigida se ha demostrado la existencia de un único promotor dependiente del factor σ^{54} en esta región y hasta 4 sitios importantes para la regulación dependiente de FleQ, siendo el efecto de los 3 más cercanos al promotor σ^{54} especialmente relevantes para la activación (Fig. 26 y 29). En la activación de este tipo de promotores, es frecuente identificar sitios de activación localizados a más de 100 pb aguas arriba del promotor, de manera que, para que se produzca el contacto necesario

Discusión

entre el activador y la ARN polimerasa, es imprescindible la formación de un lazo en la región intermedia de ADN (Reitzer *et al.*, 1989; Santero *et al.*, 1992). En el caso de la región promotora *PflgB*, la distancia que separa el promotor σ^{54} de los sitios FleQ descritos (centrados 29, 62, 98 y 118 pb aguas arriba del motivo de unión de σ^{54} , respectivamente) indica que los sitios de activación ocupan posiciones más cercanas de lo que es habitual en otros promotores dependientes de σ^{54} estudiados (Buck *et al.*, 1986; Reitzer *et al.*, 1989). A pesar de ello, nuestros resultados confirman que la proteína IHF, encargada de plegar y modificar la estructura del ADN, participa en el proceso de activación y es necesaria para que se alcancen los valores máximos de expresión (Fig. 30), lo que sugiere que en este caso también se generan cambios en la curvatura del ADN que facilitan la interacción activador-polimerasa. En ausencia de IHF, *PflgB* mantiene niveles relativamente altos de expresión indicando que su presencia es importante, aunque no esencial en el proceso de activación (Fig. 30), de forma similar a como se ha descrito en otros promotores dependientes de σ^{54} de *P. putida* como *Ppu* (Pérez-Martín *et al.*, 1994).

La relevancia de cada uno de los sitios sobre la expresión de *PflgB* es diferente, mientras que el sitio FleQ-3 es esencial para la activación, los sitios FleQ-2 y FleQ-4 tienen un papel auxiliar y el sitio FleQ-1 parece no ser relevante (Fig 29 A). El sitio principal FleQ-3 está constituido por 18 pb completamente conservados en el promotor *PflgB* de muchas otras especies de *Pseudomonas* ambientales (Fig. 28), lo que sugiere que podría tratarse de un sitio fundamental en la activación de *PflgB* en las diferentes especies de *Pseudomonas*. La presencia de múltiples sitios de unión del activador es un fenómeno ampliamente descrito en los promotores regulados por FleQ (Baraquet & Harwood, 2016) e igualmente habitual en promotores activados por otras bEBPs (Joly *et al.*, 2012). En el caso de *PflgB*, la localización de los sitios relevantes para la regulación por FleQ (Fig. 31) y el efecto que su mutación tiene sobre la expresión (Fig. 29) podría sugerir la existencia de un modelo de activación sinérgico donde participa un sitio de unión central principal (FleQ-3) y dos sitios de unión auxiliares que lo flanquean (FleQ-2 y FleQ-4) (Fig. 28), similar al previamente descrito en la activación mediada por reguladores como NorR o TyrR en *E. coli* (Justino *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 1994). Sin embargo, la escasa conservación del sitio FleQ-4 en las diferentes especies de *Pseudomonas* estudiadas, su proximidad con el promotor y el hecho de que introducir una vuelta de hélice completa entre este y el sitio de activación principal FleQ-3 no tenga ningún efecto sobre la expresión, hacen poco probable su participación en la activación. Una posibilidad es que el efecto de la mutación del sitio FleQ-4 sobre la expresión de *PflgB* se deba a la interrupción del sitio reconocido por IHF en la región promotora. Dado que los procesos de

activación requieren habitualmente de la formación de estructuras oligoméricas de mayor orden (Danson *et al.*, 2019), como los hexámeros descritos en FleQ de *P. aeruginosa* (Baraquet & Harwood, 2013), y que es necesaria una distancia concreta entre los sitios FleQ-2 y FleQ-3 para alcanzar los niveles máximos de expresión (Fig. 32 B) es probable que las moléculas de FleQ unidas a los sitios de interacción FleQ-2 y 3 interactúen entre sí para lograr los mayores niveles de transcripción en este promotor.

El análisis estructural demostró que la posición del sitio FleQ-3 respecto al promotor es esencial para la activación (Fig. 32 B), ya que la incorporación de inserciones que cambian su orientación respecto al promotor elimina la activación dependiente de FleQ. La implicación de IHF en el mecanismo de activación sugiere que la regulación de *PflgB* por FleQ implica la formación un lazo en el ADN que permite la formación de un complejo competente para la activación sólo cuando el activador unido al sitio FleQ-3 se encuentra posicionado en la misma cara de la hélice que la ARN polimerasa. Los niveles relativamente altos de expresión observados al separar los sitios FleQ-2 y FleQ-3, indican que el sitio principal FleQ-3 mantiene la capacidad para activar la expresión por sí mismo. Sin embargo, a diferencia de los resultados positivos obtenidos al ensayar fragmentos que contenían las regiones promotoras asociadas a genes de biofilm (*PlapA* y *Pbcs*), y a pesar de los repetidos intentos, no ha sido posible detectar interacción *in vitro* entre FleQ y *PflgB* mediante ensayos de retardo en gel. Es posible por tanto que la interacción en estos casos requiera de unas condiciones de ensayo distintas a las aquí empleadas. Por otra parte, aunque existen diversos estudios que demuestran la interacción de FleQ con regiones promotoras de genes implicados en formación de biofilm, no existen estudios previos que traten extensamente y en detalle la interacción de FleQ con promotores flagelares dependientes de σ^{54} , lo que sugiere que la detección de este tipo de interacción puede representar un problema complejo aún por resolver.

3. Control posicional y numérico del flagelo en *P. putida* KT2442

3.1 FlhF y FleN

El control espaciotemporal de la síntesis de flagelo es un requisito indispensable para completar con éxito etapas clave en los ciclos de vida bacterianos como la colonización de nuevos nichos u hospedadores o la búsqueda de nutrientes en el medio (Chaban *et al.*, 2015). Por ello, su regulación ha sido un tema de estudio habitual en numerosas especies (Gao *et al.*, 2015; Kusumoto *et al.*, 2008; Pandza *et al.*, 2000). En los últimos años se ha comprobado que las proteínas FlhF y FleN controlan respectivamente la posición y el número de flagelos de la mayoría de las especies con

Discusión

flagelación polar estudiadas, siendo las responsables en última instancia de determinar el patrón de flagelación (Schuhmacher *et al.*, 2015). No obstante, el mecanismo mediante el cual estas dos proteínas interactúan en cada especie para generar los distintos patrones de flagelación es desconocido en la mayoría de los casos.

Atendiendo a las imágenes de microscopía mostradas en este trabajo, la ausencia de FleN provoca fenómenos de hiperflagelación en *P. putida* KT2442 (Fig. 33 C), similares a los descritos en *V. alginolyticus* o *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2000; Kusumoto *et al.*, 2006). Este fenotipo se encuentra asociado a un incremento de la presencia en el polo celular de la proteína FliN, componente del anillo C (Fig. 34), pudiéndose además observar células con FliN localizada de manera evidente en ambos extremos. Esta modificación en la localización habitual de FliN sugiere que FleN podría ser la responsable de acotar el inicio del ensamblaje flagelar únicamente a uno de los polos. Sin embargo, a pesar de la localización bipolar de FliN en el mutante $\Delta fleN$, no se detectaron células anfitricas (con flagelos en ambos extremos) en los ensayos de microscopía realizados (Fig. 33 C), por lo que no es descartable que la formación del flagelo se mantenga inhibida en el polo aflagelado hasta etapas posteriores del ciclo celular, independientemente de la acumulación de FliN. El fenotipo de hiperflagelación observado en el mutante $\Delta fleN$ podría no deberse exclusivamente al papel que juega FleN en la localización de elementos del cuerpo basal, ya que su delección genera además un incremento en la expresión de la mayoría de los genes flagelares (Fig. 21). Entre ellos se encuentra *flhF*, cuya sobreexpresión incrementa el número de flagelos en especies como *V. cholerae* o *P. aeruginosa* (Correa *et al.*, 2005; Murray & Kazmierczak, 2006). No obstante, el doble mutante $\Delta flhF \Delta fleN$ es capaz de ensamblar más flagelos que un mutante $\Delta flhF$ (Fig. 33 C), indicando que FleN participa en el control numérico del flagelo independientemente de su efecto sobre FlhF.

Los estudios de microscopía mostraron que la proteína FlhF de *P. putida* KT2442 aparece en uno de los polos celulares al inicio del ciclo y comienza a acumularse en el contrario durante la división celular (Fig. 36 y 37). Esta distribución sugiere que actúa como proteína de referencia polar, de forma similar a lo descrito en otras especies con flagelación polar como *P. aeruginosa*, *V. cholerae* o *C. jejuni* (Murray & Kazmierczak, 2006; Green *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2018). La localización polar de FlhF se mantiene en un fondo mutante $\Delta fleQ$, incapaz de ensamblar flagelo, sugiriendo que los elementos reconocidos por esta proteína no forman parte del flagelo. Incluso más, FlhF mantiene su localización polar en una estirpe de *E. coli* que no conserva el mismo patrón de flagelación ni presenta proteínas ortólogas de FlhF o FleN (Fig. 38). Un fenómeno similar se ha descrito en la proteína FlhF de *V. alginolyticus*, capaz de localizar en el polo en un mutante

de *E. coli* que carece de FlhDC, la pareja activadora necesaria para iniciar la cascada flagelar (Kusumoto *et al.*, 2008). En células tratadas con cefsulodina, FlhF se localiza a intervalos regulares a lo largo de los filamentos no septados (Fig. 39), indicando que no se asocia a elementos específicos presentes en la propia membrana del polo o del septo.

Con esta información es posible afirmar que FlhF no reconoce características físicas presentes en polo de *P. putida* ni interacciona con otras proteínas del clúster flagelar durante su localización. Una hipótesis es que FlhF reconozca los mismos gradientes proteicos encargados de posicionar el septo durante la división celular (Bisicchia *et al.*, 2013). La relación entre la localización del flagelo y el ciclo celular ha sido ampliamente estudiada y probada en *C. crescentus* (Davis *et al.*, 2013; Ardissonne & Viollier, 2015), aunque continúa siendo desconocida en especies como *Pseudomonas* spp., donde no existen estudios específicos que respalden la existencia de un mecanismo de regulación común que conecte ambos procesos.

A pesar de que FlhF mantiene predominantemente su localización polar en los fondos genéticos previamente descritos ($\Delta fleQ$ y *E. coli*), la localización polar de FlhF se ve ligeramente alterada en ausencia de FleN, observándose focos con localización subpolar o deslocalizados en algunas células (Fig. 37). Aunque en este fondo genético aumenta la expresión del gen *flhF* nativo (Fig. 22), estos fenómenos de deslocalización no se observan al sobreexpresar FlhF-GFP de forma ectópica (datos no mostrados), lo que sugiere que los defectos se deben a la ausencia de FleN y no al aumento en la cantidad de FlhF en la célula. Fenómenos similares han sido descritos en otras especies como *V. alginolyticus* (Kusumoto *et al.*, 2008), aunque el mecanismo mediante el cual FleN altera la localización de FlhF es desconocido.

La delección de *flhF* en *P. putida* KT2442 da lugar células con menos flagelos que la estirpe silvestre y habitualmente deslocalizados (Fig. 33 C), lo que sugiere que FlhF, además de actuar como referencia polar, también es necesario para el ensamblaje del número apropiado de flagelos. En ausencia de FlhF, la proteína del cuerpo basal del flagelo FliN es incapaz de formar focos detectables en la mayoría de las células (Fig. 34), lo que sugiere que FlhF participa en las primeras etapas del ensamblaje, antes de la incorporación de FliN al anillo C. Estos resultados concuerdan con lo descrito en *V. cholerae*, donde FlhF participa en el reclutamiento de FliF, la primera proteína estructural que se ensambla en el polo celular durante la síntesis flagelar (Green *et al.*, 2009).

3.2 Papel de FimV en la localización del flagelo y el sistema de quimiotaxis

La proteína FimV fue descrita por primera vez como un factor implicado en la localización de los *pili* tipo IV y la movilidad tipo *twitching* en *P. aeruginosa* (Semmler *et al.*, 2000). Posteriormente, especialmente en especies de *Vibrio*, diferentes estudios han permitido caracterizarla como una proteína de referencia para la localización en el polo celular (Yamaichi *et al.*, 2012; Takekawa *et al.*, 2016). En *V. cholerae*, HubP, ortólogo de FimV, se encarga de reclutar en el polo celular a diferentes proteínas de la familia ParA, entre las que se encuentra ParA1, encargada de la segregación cromosómica previa a la división (Fogel & Waldor, 2006), ParC, localizadora del sistema de quimiotaxis o FleN (Kirkpatrick & Viollier, 2012). Sin embargo, la información disponible en *P. putida* KT2442 es mucho más limitada.

Los ensayos de microscopía muestran que FimV localiza en el polo celular en *P. putida* (Fig. 44), al igual que ocurre en el resto de microorganismos en los que la proteína ha sido estudiada (Takekawa *et al.*, 2016; Carter *et al.*, 2017). Esta localización se conserva en los fondos mutantes $\Delta fleQ$, $\Delta flhF$ y $\Delta fleN$ (Fig. 44), indicando que FimV podría reconocer y anclarse a elementos del polo de forma autónoma y no a través de otras proteínas auxiliares codificadas en el clúster flagelar. Una posibilidad es que lo haga mediante el dominio de unión a peptidoglicano LysM presente en su secuencia (Buist *et al.*, 2008). Sin embargo, los ensayos realizados en células que no forman septo demuestran que FimV se localiza en zonas alejadas de los polos a medida que la célula se elonga (Fig. 45), sugiriendo que su localización polar no depende exclusivamente del reconocimiento de elementos presentes en el peptidoglicano de esta región.

Como se menciona previamente, entre las funciones que se le asignan a FimV en *Vibrio* estaría la de localizar en el polo celular a la proteína ParC, encargada a su vez de la localización polar del sistema de quimiotaxis (Ringgaard *et al.*, 2011; Ringgaard *et al.*, 2018). En *P. putida*, la proteína ParC se encuentra codificada dentro del clúster flagelar y presenta localización polar (Fig. 50). La proteína ParC resulta fundamental para la correcta localización de los receptores del sistema de quimiotaxis Aer-1 y Aer-2 en el polo celular (Fig. 51), indicando que participa en la localización de, al menos, parte del sistema de quimiotaxis en este microorganismo. La ausencia de FimV altera la distribución habitual de ParC, que pierde su localización polar y es incapaz de formar focos detectables en la célula (Fig. 50). En *V. cholerae*, el mutante $\Delta fimV$ mantiene los focos formados por ParC, aunque éstos aparecen mayoritariamente deslocalizados (Takekawa *et al.*, 2016), lo que pone de manifiesto diferencias en el sistema que controla la localización de estas proteínas en ambas especies. A pesar de que ParC pierde su

localización polar en el mutante $\Delta fimV$, las deleciones de *parC* y *fimV* no tienen el mismo efecto sobre la localización de los receptores de quimiotaxis estudiados. Paradójicamente, la localización polar de los receptores Aer-1 y Aer-2 se mantiene en el mutante $\Delta fimV$ a pesar de que es incapaz de localizar correctamente ParC, lo que sugiere que es la función, y no la localización polar de ParC, la responsable de localizar correctamente los receptores de quimiotaxis. Un fenómeno similar ha sido descrito en *P. aeruginosa*, donde la presencia de las proteínas del complejo POC, que carecen de localización polar, resulta imprescindible para que FlhF localice en el polo (Cowles *et al.*, 2013). Esta hipótesis está apoyada también por los resultados obtenidos en los ensayos de quimiotaxis. Según estos, la estirpe mutante $\Delta fimV$, con capacidad para localizar correctamente los receptores de quimiotaxis, presenta una respuesta quimiotáctica positiva, mientras que la estirpe mutante $\Delta parC$, en la que los receptores pierden su localización, es defectiva en quimiotaxis (Fig. 54). En *V. cholerae*, por el contrario, la localización polar de ParC es necesaria para la localización del conjunto de quimiorreceptores y moléculas encargadas de la señalización del sistema de quimiotaxis (Yamaichi *et al.*, 2012).

Por su parte, la interacción de FimV con FlhF ha sido descrita en *V. cholerae* (Yamaichi *et al.*, 2012), sin embargo, los fenómenos de deslocalización, sobreacumulación y la aparición de polos huérfanos que se observan al expresar FlhF en el fondo mutante $\Delta fimV$ de *P. putida* KT2442 (Fig. 48), no han sido descritos hasta el momento en ninguna otra de las especies en las que se ha estudiado. Dados estos efectos, no es descartable que una posible interacción entre ambas en *P. putida* sea la responsable de la correcta localización y distribución de FlhF en los polos celulares. Sin embargo, la localización polar de FlhF en *E. coli* (Fig. 38), que no presenta ortólogo de FimV, contradice esta hipótesis.

El efecto que FimV tiene sobre la localización de componentes como FlhF o ParC, sugiere que ocupa un lugar clave en la cascada de acontecimientos que determinan la localización del flagelo y del sistema de quimiotaxis. Por otra parte, FlhF y ParC no regulan mutuamente su localización, indicando que forman parte de rutas diferentes y no de la misma vía de localización. En conjunto, los resultados sugieren la existencia de una vía de regulación común, donde FimV actúa como proteína localizadora principal, y 2 vías divergentes: una de ellas encargada de localizar el sistema flagelar con FlhF como proteína de referencia y un segundo sistema responsable de la correcta localización del sistema de quimiotaxis, con ParC como proteína localizadora clave (Fig. 60). Un sistema similar donde participan 2 vías independientes que controlan la localización de cada uno de los sistemas se ha propuesto también en otros microorganismos como *Shewanella putrefaciens* (Rossmann *et al.*, 2015).

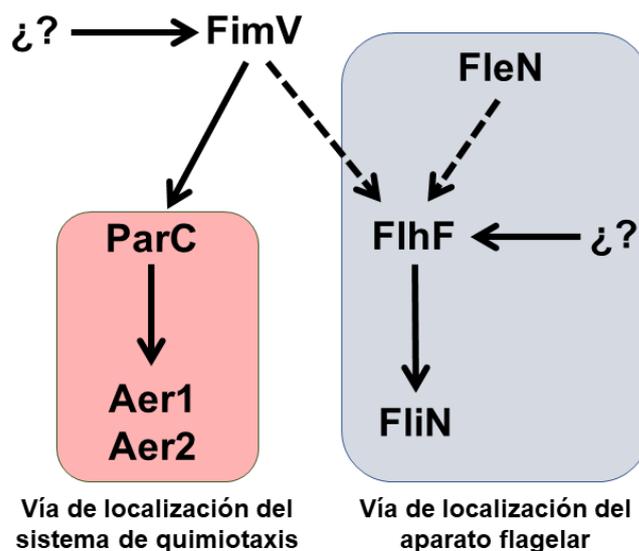


Figura 60. Modelo de la cascada de localización del aparato flagelar y de quimiotaxis en *P. putida* KT2442. Las líneas negras indican dependencia absoluta para la localización entre ambos elementos, las líneas discontinuas indican una dependencia parcial de la localización. Los signos de interrogación hacen referencia a factores por el momento desconocidos que posibilitan la localización de una determinada proteína.

Este modelo (Fig. 60) explicaría los defectos en la movilidad tipo *swimming* y *swarming* observados en el mutante $\Delta fimV$ (Fig. 41), dado que estos podrían asociarse a la deslocalización de ParC, FlhF o ambas proteínas. Sin embargo, con los datos obtenidos hasta el momento no es posible descartar que FimV regule además otros aspectos relacionados con el ensamblaje o el propio funcionamiento del flagelo.

La sobreexpresión de FimV-GFP provoca la aparición de células con morfología aberrante (Fig. 43), similares a las observadas cuando se encuentran mutados elementos implicados en la división celular como MinCD en *E. coli* (Bisicchia *et al.*, 2013). Fenotipos similares han sido identificados en otras especies como *L. pneumophila* o *P. aeruginosa*, donde la sobreexpresión de FimV genera alteraciones morfológicas y graves problemas en la movilidad tipo *twitching* (dependiente de *pili* tipo IV) (Semmler *et al.*, 2000; Coil & Anné, 2010). Estos resultados sugieren que FimV podría interaccionar, entre otros, con elementos reguladores de la síntesis de peptidoglicano o del propio ciclo celular. Semmler y colaboradores apoyan esta hipótesis (Semmler *et al.*, 2000), aunque hasta la fecha no se han descrito fenómenos de interacción con ninguno de los elementos implicados en la formación del divisoma.

En su conjunto, durante este trabajo se ha caracterizado la interacción entre el activador FleQ, el regulador FleN y los niveles del segundo mensajero di-GMPc durante la regulación de los principales genes asociados a la formación de biofilm y a la biosíntesis del flagelo en *P. putida* KT2442. Los resultados han permitido plantear un nuevo modelo de activación transcripcional de los genes flagelares en este microorganismo, así como realizar una caracterización en detalle del mecanismo de activación por FleQ de la expresión de *PflgB*. Además de la regulación génica, se ha caracterizado el papel de las proteínas FliH y FleN en la determinación del patrón de localización flagelar y se han propuesto nuevos elementos relevantes en este proceso, como FimV o ParC. Dada la complejidad de las rutas de regulación estudiadas y los numerosos elementos implicados aún quedan muchas incógnitas por resolver. Sin embargo, los resultados presentados en esta tesis suponen el punto de partida a partir del cual profundizar en los diferentes mecanismos moleculares que determinan el estilo de vida en *P. putida* KT2442.

Conclusiones

Conclusiones

1. FleQ regula de manera inversa la expresión de los genes relacionados con la formación de biofilm: activa la expresión de *lapA* y reprime la del operón que codifica la celulosa sintasa.
2. El di-GMPc induce la expresión de *lapA* y el operón *bcs* mientras que FleN modula la respuesta de FleQ a los niveles de di-GMPc. FleN antagoniza la acción de FleQ en condiciones de bajo di-GMPc en ambos promotores, mientras que en condiciones de alto di-GMPc, FleN actúa sinérgicamente con FleQ para activar *P_{lapA}* y no modifica la expresión de *P_{bcs}*.
3. FleQ interacciona de forma directa con al menos un sitio en la región promotora de *bcs* y al menos dos en la de *lapA*. El di-GMPc potencia la interacción con *P_{lapA}* mientras que inhibe la unión en el caso de *P_{bcs}*.
4. La expresión del regulador principal FleQ no se encuentra autorregulada ni depende de otros reguladores contenidos en el clúster flagelar como FleR o FleN.
5. Todos los promotores del clúster flagelar dependen de manera directa o indirecta de FleQ y del factor σ alternativo σ^{54} .
6. Más de la mitad de los promotores identificados en el clúster flagelar son activados por FleQ de manera directa. FleN y di-GMPc antagonizan esta activación.
7. El activador transcripcional FleR activa de forma modesta la expresión de algunos de los promotores regulados por FleQ, aunque no es imprescindible para la formación de flagelo ni para la correcta movilidad tipo *swimming*.
8. El factor σ alternativo FliA es necesario para la expresión de ocho de los promotores del clúster flagelar. La mayoría de ellos controlan operones que codifican elementos implicados en las últimas etapas del ensamblaje flagelar y en la quimiotaxis.

9. Se ha propuesto una cascada jerárquica de activación flagelar en *P. putida* KT2442, donde los genes se dividen en 3 clases: clase I, con *fleQ* como único miembro, clase II, que incluye los genes dependientes de σ^{54} activados por FleQ y clase III, que contiene a los genes dependientes de FliA (clase III).
10. La región promotora *PflgB* contiene un promotor dependiente de σ^{54} y hasta 4 posibles sitios implicados en la regulación por FleQ, siendo el sitio FleQ-3 el que presenta mayor efecto sobre la expresión. La relevancia que tienen para la activación tanto la proteína auxiliar IHF como la orientación del sitio FleQ-3 respecto al promotor sugieren la formación de un lazo que conecta el activador con la polimerasa.
11. FlhF participa en el control posicional del flagelo y el ensamblaje del cuerpo basal mientras que FleN regula negativamente el número de flagelos.
12. FlhF se acumula en el polo en cualquier momento del ciclo celular y su localización no requiere de la formación del septo de división.
13. FleN previene la sobreacumulación y participa en la localización polar de FlhF en el polo celular.
14. La proteína FimV se localiza en los polos celulares y su eliminación altera la localización y la dinámica de acumulación de FlhF a lo largo del ciclo celular.
15. FimV controla la localización polar de ParC, de cuya actividad depende la localización de los receptores del sistema de quimiotaxis Aer-1 y Aer-2.

Referencias

- Aberg, A., Shingler, V. y Balsalobre, C.** (2006). (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol. Microbiol.* **60**, 1520–1533.
- Agladze, K., Wang, X. y Romeo, T.** (2005). Spatial Periodicity of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Microstructure Initiates during a Reversible, Polar Attachment Phase of Development and Requires the Polysaccharide Adhesin PGA. *J. Bacteriol.* **187**, 8237–8246.
- Ainelo, H., Lahesaare, A., Teppo, A., Kivisaar, M. y Teras, R.** (2017). The promoter region of *lapA* and its transcriptional regulation by Fis in *Pseudomonas putida*. *PLOS ONE* **12**, e0185482.
- Aldridge, P. y Hughes, K. T.** (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 160–165.
- Allison, D. G., Evans, D. J., Brown, M. R. y Gilbert, P.** (1990). Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms. *J. Bacteriol.* **172**, 1667–1669.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Anderson, J. K., Huang, J. Y., Wreden, C., Sweeney, E. G., Goers, J., Remington, S. J. y Guillemin, K.** (2015). Chemorepulsion from the Quorum Signal Autoinducer-2 Promotes *Helicobacter pylori* Biofilm Dispersal. *mBio* **6**, e00379-15.
- Andrade, M. O., Alegria, M. C., Guzzo, C. R., Docena, C., Rosa, M. C. P., Ramos, C. H. I. y Farah, C. S.** (2006). The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Mol. Microbiol.* **62**, 537–551.
- Ardissone, S. y Viollier, P. H.** (2015). Interplay between flagellation and cell cycle control in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**, 83–92.
- Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Pastor-Palacios, G., Briebe, L. G. y Álvarez-Morales, A.** (2011). Integration Host Factor (IHF) binds to the promoter region of the *phtD* operon involved in phaseolotoxin synthesis in *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121. *BMC Microbiol* **11**, 90.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. y Lindberg, M.** (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 163–167.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Rückert, B., Franklin, F. C. H., Bagdasarian, M. M., Frey, J. y Timmis, K. N.** (1981). Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**, 237–247.

Referencias

- Balaban, M. y Hendrixson, D. R.** (2011). Polar Flagellar Biosynthesis and a Regulator of Flagellar Number Influence Spatial Parameters of Cell Division in *Campylobacter jejuni*. *PLOS Pathogens* **7**, e1002420.
- Balaban, M., Joslin, S. N. y Hendrixson, D. R.** (2009). FlhF and Its GTPase Activity Are Required for Distinct Processes in Flagellar Gene Regulation and Biosynthesis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* **191**, 6602–6611.
- Bange, G., Petzold, G., Wild, K., Parlitz, R. O. y Sinning, I.** (2007). The crystal structure of the third signal-recognition particle GTPase FlhF reveals a homodimer with bound GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13621–13625.
- Bange, G., Kümmerer, N., Grudnik, P., Lindner, R., Petzold, G., Kressler, D., Hurt, E., Wild, K. y Sinning, I.** (2011). Structural basis for the molecular evolution of SRP-GTPase activation by protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1376–1380.
- Baranova, D. E., Levinson, K. J. y Mantis, N. J.** (2018). *Vibrio cholerae* O1 secretes an extracellular matrix in response to antibody-mediated agglutination. *PLOS ONE* **13**, e0190026.
- Baraquet, C. y Harwood, C. S.** (2013). Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *PNAS* **110**, 18478–18483.
- Baraquet, C. y Harwood, C. S.** (2016). FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **198**, 178–186.
- Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. y Harwood, C. S.** (2012). The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7207–7218.
- Barembuch, C. y Hengge, R.** (2007). Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol. Microbiol.* **65**, 76–89.
- Barrios, H., Valderrama, B. y Morett, E.** (1999). Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4305–4313.
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., Bergen, M. von, Steiniger, F., Wick, L. Y. y Heipieper, H. J.** (2012). Membrane Vesicle Formation as a Multiple-Stress Response Mechanism Enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E Cell Surface Hydrophobicity and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6217–6224.
- Benson, A. K., Wu, J. y Newton, A.** (1994). The role of FlbD in regulation of flagellar gene transcription in *Caulobacter crescentus*. *Res. Microbiol.* **145**, 420–430.

- Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A. y Brun, Y. V.** (2018). Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 616–627.
- Bisicchia, P., Arumugam, S., Schwille, P. y Sherratt, D.** (2013). MinC, MinD, and MinE drive counter-oscillation of early-cell-division proteins prior to *Escherichia coli* septum formation. *MBio* **4**, e00856-00813.
- Blair, D. F. y Berg, H. C.** (1988). Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science* **242**, 1678–1681.
- Blanco-Romero, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Garrido-Sanz, D., Ramos-González, M. I., Martín, M. y Rivilla, R.** (2018). Genome-wide analysis of the FleQ direct regulon in *Pseudomonas fluorescens* F113 and *Pseudomonas putida* KT2440. *Sci Rep* **8**.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V. y Jenal, U.** (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**, 107–116.
- Boks, N. P., Norde, W., van der Mei, H. C. y Busscher, H. J.** (2008). Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**, 3122–3133.
- Boles, B. R. y Horswill, A. R.** (2008). agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLOS Pathogens* **4**, e1000052.
- Boles, B. R., Thoendel, M. y Singh, P. K.** (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *PNAS* **101**, 16630–16635.
- Boltz, J. P., Smets, B. F., Rittmann, B. E., van Loosdrecht, M. C. M., Morgenroth, E. y Daigger, G. T.** (2017). From biofilm ecology to reactors: a focused review. *Water Sci Technol* **75**, 1753–1760.
- Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J. y Parsek, M. R.** (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **75**, 827–842.
- Boyd, A. y Chakrabarty, A. M.** (1994). Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2355–2359.
- Boyd, C. D., Chatterjee, D., Sondermann, H. y O’Toole, G. A.** (2012). LapG, Required for Modulating Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, Is a Calcium-Dependent Protease. *Journal of Bacteriology* **194**, 4406–4414.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Brun, Y. V. y Shapiro, L.** (1992). A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter*. *Genes Dev.* **6**, 2395–2408.

Referencias

- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. y Dixon, R.** (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**, 374.
- Buck, M., Gallegos, M. T., Studholme, D. J., Guo, Y. y Gralla, J. D.** (2000). The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**, 4129–4136.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J. y Kuipers, O. P.** (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol. Microbiol.* **68**, 838–847.
- Burkart, M., Toguchi, A. y Harshey, R. M.** (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2568–2573.
- Bush, M. y Dixon, R.** (2012). The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ^{54} -Dependent Transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 497–529.
- Cairns, L. S., Marlow, V. L., Bissett, E., Ostrowski, A. y Stanley-Wall, N. R.** (2013). A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **90**, 6–21.
- Cannon, W., Austin, S., Moore, M. y Buck, M.** (1995). Identification of close contacts between the σ^N (σ^{54}) protein and promoter DNA in closed promoter complexes. *Nucleic Acids Research - NAR* **23**, 351–356.
- Cárcamo-Oyarce, G., Lumjiaktase, P., Kümmerli, R. y Eberl, L.** (2015). Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from *Pseudomonas putida* biofilms. *Nat Commun* **6**, 5945.
- Carter, T., Buensuceso, R. N. C., Tammam, S., Lamers, R. P., Harvey, H., Howell, P. L. y Burrows, L. L.** (2017). The Type IVa Pilus Machinery Is Recruited to Sites of Future Cell Division. *mBio* **8**,.
- Cases, I., Ussery, D. W. y Lorenzo, V. D.** (2003). The σ^{54} regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **5**, 1281–1293.
- Chaban, B., Hughes, H. V. y Beeby, M.** (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin. Cell Dev. Biol.* **46**, 91–103.
- Chadsey, M. S. y Hughes, K. T.** (2001). A multipartite interaction between *Salmonella* transcription factor σ^{28} and its anti-sigma factor FlgM: implications for σ^{28} holoenzyme destabilization through stepwise binding. *J Mol Biol* **306**, 915–929.
- Chadsey, M. S., Karlinsey, J. E. y Hughes, K. T.** (1998). The flagellar anti- σ factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* σ^{28} RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev* **12**, 3123–3136.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U. y Schirmer, T.** (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17084–17089.

- Chanchal, null, Banerjee, P. y Jain, D.** (2017). ATP-Induced Structural Remodeling in the Antiactivator FleN Enables Formation of the Functional Dimeric Form. *Structure* **25**, 243–252.
- Chang, W.-S., Mortel, M. van de, Nielsen, L., Guzman, G. N. de, Li, X. y Halverson, L. J.** (2007). Alginate Production by *Pseudomonas putida* Creates a Hydrated Microenvironment and Contributes to Biofilm Architecture and Stress Tolerance under Water-Limiting Conditions. *Journal of Bacteriology* **189**, 8290–8299.
- Choi, K.-H., Gaynor, J. B., White, K. G., Lopez, C., Bosio, C. M., Karkhoff-Schweizer, R. R. y Schweizer, H. P.** (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**, 443–448.
- Choi, K.-H., Kumar, A. y Schweizer, H. P.** (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* **64**, 391–397.
- Chou, S.-H. y Galperin, M. Y.** (2016). Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J. Bacteriol.* **198**, 32–46.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M. G., Folcher, M., Jenö, P., Grzesiek, S. y Jenal, U.** (2007). DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4112–4117.
- Christen, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R. y Miller, S. I.** (2010). Asymmetrical Distribution of the Second Messenger c-di-GMP upon Bacterial Cell Division. *Science* **328**, 1295–1297.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. y Greenberg, E. P.** (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **98**, 2752–2757.
- Chun, S. Y. y Parkinson, J. S.** (1988). Bacterial motility: membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**, 276–278.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. y Miller, R. H.** (1989). One-Step Preparation of Competent *Escherichia coli*: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2172–2175.
- Clark, W. A.** (1976). A Simplified Leifson Flagella Stain. *J Clin Microbiol* **3**, 632–634.
- Coil, D. A. y Anné, J.** (2010). The role of *fimV* and the importance of its tandem repeat copy number in twitching motility, pigment production, and morphology in *Legionella pneumophila*. *Arch. Microbiol.* **192**, 625–631.

Referencias

- Collier, J., Murray, S. R. y Shapiro, L. (2006). DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. *EMBO J* **25**, 346–356.
- Conrad, A., Suutari, M. K., Keinänen, M. M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L. y Block, J.-C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* **38**, 1093–1105.
- Correa, N. E., Peng, F. y Klose, K. E. (2005). Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J. Bacteriol.* **187**, 6324–6332.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. y Marrie, T. J. (1987). Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* **41**, 435–464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. y Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711–745.
- Cowles, K. N., Moser, T. S., Siryaporn, A., Nyakudarika, N., Dixon, W., Turner, J. J. y Gitai, Z. (2013). The putative Poc complex controls two distinct *Pseudomonas aeruginosa* polar motility mechanisms. *Mol Microbiol* **90**, 923–938.
- Dahlstrom, K. M. y O'Toole, G. A. (2017). A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 179–195.
- Dahlstrom, K. M., Giglio, K. M., Sondermann, H. y O'Toole, G. A. (2016). The Inhibitory Site of a Diguanylate Cyclase Is a Necessary Element for Interaction and Signaling with an Effector Protein. *J. Bacteriol.* **198**, 1595–1603.
- Danson, A. E., Jovanovic, M., Buck, M. y Zhang, X. (2019). Mechanisms of σ^{54} -Dependent Transcription Initiation and Regulation. *Journal of Molecular Biology*.
- Dasgupta, N. y Ramphal, R. (2001). Interaction of the Antiactivator FleN with the Transcriptional Activator FleQ Regulates Flagellar Number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 6636–6644.
- Dasgupta, N., Arora, S. K. y Ramphal, R. (2000). *fleN*, a Gene That Regulates Flagellar Number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 357–364.
- Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. E. H. y Ramphal, R. (2002). *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **184**, 5240–5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S. y Ramphal, R. (2003). A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**, 809–824.
- Davies, D. G. (2011). Biofilm Dispersion. In *Biofilm Highlights* (ed. Flemming, H.-C.), Wingender, J.), and Szewzyk, U.), pp. 1–28. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Davis, N. J., Cohen, Y., Sanselicio, S., Fumeaux, C., Ozaki, S., Luciano, J., Guerrero-Ferreira, R. C., Wright, E. R., Jenal, U. y Viollier, P. H.** (2013). De- and repolarization mechanism of flagellar morphogenesis during a bacterial cell cycle. *Genes Dev.* **27**, 2049–2062.
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. y Lewandowski, Z.** (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1131–1138.
- de Kievit, T. R. y Iglewski, B. H.** (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**, 4839–4849.
- Díaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jiménez-Fernández, A., Wirebrand, L., Velasco-Domínguez, M. G., López-Sánchez, A., Shingler, V. y Govantes, F.** (2017). The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Sci Rep* **7**, 18055.
- Diepold, A. y Armitage, J. P.** (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Phil. Trans. R. Soc. B* **370**, 20150020.
- Dutton, R. J., Xu, Z. y Gober, J. W.** (2005). Linking structural assembly to gene expression: a novel mechanism for regulating the activity of a σ^{54} transcription factor. *Mol Microbiol* **58**, 743–757.
- Edgar, R. C.** (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 113.
- Elowitz, M. B. y Leibler, S.** (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403**, 335–338.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A. y Ramos, J.-L.** (2000). Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. *Journal of Bacteriology* **182**, 2363–2369.
- Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M. L., Givskov, M., Eberl, L. y Tolker-Nielsen, T.** (2014). Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ. Microbiol.* **16**, 1961–1981.
- Ferris, H. U., Furukawa, Y., Minamino, T., Kroetz, M. B., Kihara, M., Namba, K. y Macnab, R. M.** (2005). FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**, 41236–41242.
- Figurski, D. H. y Helinski, D. R.** (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648–1652.
- Flemming, H.-C. y Wingender, J.** (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 623–633.
- Fletcher, M.** (1996). *Bacterial adhesion : molecular and ecological diversity*. New York : Wiley.
- Fogel, M. A. y Waldor, M. K.** (2005). Distinct segregation dynamics of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Mol. Microbiol.* **55**, 125–136.

Referencias

- Fogel, M. A. y Waldor, M. K.** (2006). A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* **20**, 3269–3282.
- Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. y DeRosier, D. J.** (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**, 1261–1270.
- Franklin, F. C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M. M. y Timmis, K. N.** (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWVO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7458–7462.
- Friedman, D. I.** (1988). Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**, 545–554.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S. K. y Ramphal, R.** (2002). Identification and functional characterization of *flgM*, a gene encoding the anti- σ^{28} factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**, 1514–1521.
- Frye, J., Karlinsey, J. E., Felise, H. R., Marzolf, B., Dowidar, N., McClelland, M. y Hughes, K. T.** (2006). Identification of New Flagellar Genes of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**, 2233–2243.
- Fuqua, C.** (2010). Passing the Baton Between Laps: Adhesion and Cohesion in *Pseudomonas putida* Biofilms. *Mol Microbiol* **77**, 533–536.
- Gaca, A. O., Colomer-Winter, C. y Lemos, J. A.** (2015). Many Means to a Common End: the Intricacies of (p)ppGpp Metabolism and Its Control of Bacterial Homeostasis. *J Bacteriol* **197**, 1146–1156.
- Gal, M., Preston, G. M., Massey, R. C., Spiers, A. J. y Rainey, P. B.** (2003). Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Mol. Ecol.* **12**, 3109–3121.
- Galperin, M. Y.** (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**, 552–567.
- Gao, R. y Stock, A. M.** (2010). Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 160–167.
- Gao, T., Shi, M., Ju, L. y Gao, H.** (2015). Investigation into FlhFG reveals distinct features of FlhF in regulating flagellum polarity in *Shewanella oneidensis*. *Mol. Microbiol.* **98**, 571–585.
- Gao, T., Shi, M. y Gao, H.** (2018). Partially Reciprocal Replacement of FlrA and FlrC in Regulation of *Shewanella oneidensis* Flagellar Biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **200**, e00796-17.
- García-González, V., Govantes, F., Porrúa, O. y Santero, E.** (2005). Regulation of the *Pseudomonas* spp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J. Bacteriol.* **187**, 155–167.

- Gardel, C. L. y Mekalanos, J. J.** (1996). Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun* **64**, 2246–2255.
- Ghafoor, A., Hay, I. D. y Rehm, B. H. A.** (2011). Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Appl Environ Microbiol* **77**, 5238–5246.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. y Tolker-Nielsen, T.** (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**, 894–906.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L. y Tolker-Nielsen, T.** (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol. Microbiol.* **75**, 815–826.
- Gober, J. W. y Shapiro, L.** (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Mol Biol Cell* **3**, 913–926.
- Goodman, A. L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. S. y Lory, S.** (2004). A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* **7**, 745–754.
- Gotoh, N., Nunomura, K. y Nishino, T.** (1990). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *J Antimicrob Chemother* **25**, 513–523.
- Govantes, F. y Santero, E.** (1996). Transcription termination within the regulatory *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *Molec. Gen. Genet.* **250**, 447–454.
- Green, J. C. D., Kahramanoglou, C., Rahman, A., Pender, A. M. C., Charbonnel, N. y Fraser, G. M.** (2009). Recruitment of the earliest component of the bacterial flagellum to the old cell division pole by a membrane-associated signal recognition particle family GTP-binding protein. *J. Mol. Biol.* **391**, 679–690.
- Gründling, A., Burrack, L. S., Bower, H. G. A. y Higgins, D. E.** (2004). *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12318–12323.
- Gulbranson, C. J., Ribardo, D. A., Balaban, M., Knauer, C., Bange, G. y Hendrixson, D. R.** (2016). FlhG employs diverse intrinsic domains and influences FlhF GTPase activity to numerically regulate polar flagellar biogenesis in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **99**, 291–306.
- Guttenplan, S. B. y Kearns, D. B.** (2013). Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 849–871.
- Guttenplan, S. B., Shaw, S. y Kearns, D. B.** (2013). The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **87**, 211–229.

Referencias

- Güvener, Z. T. y Harwood, C. S.** (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology* **66**, 1459–1473.
- Ha, D.-G. y O'Toole, G. A.** (2015). c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* **3**, MB-0003-2014.
- Haiko, J. y Westerlund-Wikström, B.** (2013). The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology (Basel)* **2**, 1242–1267.
- Hammer, B. K. y Bassler, B. L.** (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **50**, 101–104.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Harwood, C. S., Fosnaugh, K. y Dispensa, M.** (1989). Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior. *J Bacteriol* **171**, 4063–4066.
- He, H., Cooper, J. N., Mishra, A. y Raskin, D. M.** (2012). Stringent Response Regulation of Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **194**, 2962–2972.
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 263–273.
- Hengge, R.** (2010). Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal* **3**, pe44.
- Hervás, A. B., Canosa, I. y Santero, E.** (2010). Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions. *Mol. Microbiol.* **78**, 305–319.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Cámara, M., Williams, P. y Haas, D.** (2004). Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **186**, 2936–2945.
- Hickman, J. W. y Harwood, C. S.** (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* **69**, 376–389.
- Hinsa, S. M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L. y O'Toole, G. A.** (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**, 905–918.
- Hintsche, M., Waljor, V., Großmann, R., Kühn, M. J., Thormann, K. M., Peruani, F. y Beta, C.** (2017). A polar bundle of flagella can drive bacterial swimming by pushing, pulling, or coiling around the cell body. *Scientific Reports* **7**, 16771.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. y Aizawa, S.** (1994). Roles of FliK and FliB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* **176**, 5439–5449.

- Hirano, T., Minamino, T., Namba, K. y Macnab, R. M.** (2003). Substrate specificity classes and the recognition signal for Salmonella type III flagellar export. *J. Bacteriol.* **185**, 2485–2492.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. y Schweizer, H. P.** (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77–86.
- Homma, M., Komeda, Y., Iino, T. y Macnab, R. M.** (1987). The flaFIX gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *Journal of Bacteriology* **169**, 1493–1498.
- Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S. y Kustu, S.** (1990). The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**, 11–22.
- Huangyutitham, V., Güvener, Z. T. y Harwood, C. S.** (2013). Subcellular Clustering of the Phosphorylated WspR Response Regulator Protein Stimulates Its Diguanylate Cyclase Activity. *mBio* **4**, e00242-13.
- Ikebe, T., Iyoda, S. y Kutsukake, K.** (1999). Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **145**, 1389–1396.
- Imada, K.** (2018). Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophys Rev* **10**, 559–570.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H.** (1990). Inoue, H. , Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28. *Gene* **96**, 23–8.
- Irie, Y., Borlee, B. R., O'Connor, J. R., Hill, P. J., Harwood, C. S., Wozniak, D. J. y Parsek, M. R.** (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 20632–20636.
- Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B. y Kaplan, J. B.** (2008). Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**, 470–476.
- Jackson, D. W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J. W., Hart, M. E. y Romeo, T.** (2002). Biofilm Formation and Dispersal under the Influence of the Global Regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 290–301.
- Jäger-Zürn, I. y Grubert, M.** (2000). *Podostemaceae* Depend on Sticky Biofilms with Respect to Attachment to Rocks in Waterfalls. *International Journal of Plant Sciences* **161**, 599–607.
- Jain, R. y Kazmierczak, B. I.** (2014). A Conservative Amino Acid Mutation in the Master Regulator FleQ Renders *Pseudomonas aeruginosa* Aflagellate. *PLoS ONE* **9**, e97439.

Referencias

- Jenal, U., Reinders, A. y Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology* **15**, 271–284.
- Jiménez-Fernández, A., López-Sánchez, A., Calero, P. y Govantes, F. (2015). The c-di-GMP phosphodiesterase BifA regulates biofilm development in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology Reports* **7**, 78–84.
- Jiménez-Fernández, A., López-Sánchez, A., Jiménez-Díaz, L., Navarrete, B., Calero, P., Platero, A. I. y Govantes, F. (2016). Complex Interplay between FleQ, Cyclic Diguanylate and Multiple σ Factors Coordinately Regulates Flagellar Motility and Biofilm Development in *Pseudomonas putida*. *PLOS ONE* **11**, e0163142.
- Joly, N., Zhang, N., Buck, M. y Zhang, X. (2012). Coupling AAA protein function to regulated gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**, 108–116.
- Jones, D. S. y Schofield, J. P. (1990). A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **18**, 7463–7464.
- Jones, D. M., Curry, A. y Fox, A. J. (1985). An ultrastructural study of the gastric campylobacter-like organism “*Campylobacter pyloridis*”. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2335–2341.
- Jones, C. J., Utada, A., Davis, K. R., Thongsomboon, W., Sanchez, D. Z., Banakar, V., Cegelski, L., Wong, G. C. L. y Yildiz, F. H. (2015). C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathogens* **11**, e1005068.
- Jovanovic, G., Weiner, L. y Model, P. (1996). Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J. Bacteriol.* **178**, 1936–1945.
- Justino, M. C., Gonçalves, V. M. M. y Saraiva, L. M. (2005). Binding of NorR to three DNA sites is essential for promoter activation of the flavorubredoxin gene, the nitric oxide reductase of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**, 540–544.
- Jyot, J., Dasgupta, N. y Ramphal, R. (2002). FleQ, the Major Flagellar Gene Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, Binds to Enhancer Sites Located Either Upstream or Atypically Downstream of the RpoN Binding Site. *J Bacteriol* **184**, 5251–5260.
- Karatan, E. y Watnick, P. (2009). Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 310–347.
- Karlinsey, J. E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S. I. y Hughes, K. T. (2000). Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol. Microbiol.* **37**, 1220–1231.

- Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N. y Aizawa, S.-I.** (1996). Geometry of the Flagellar Motor in the Cytoplasmic Membrane of *Salmonella typhimurium* as Determined by Stereo-photogrammetry of Quick-freeze Deep-etch Replica Images. *Journal of Molecular Biology* **255**, 458–475.
- Kazmierczak, B. I. y Hendrixson, D. R.** (2013). Spatial and Numerical Regulation of Flagellar Biosynthesis in Polarly-Flagellated Bacteria. *Mol Microbiol* **88**, 655–663.
- Khan, S. y Scholey, J. M.** (2018). Assembly, Functions and Evolution of Archaeella, Flagella and Cilia. *Current Biology* **28**, R278–R292.
- Khan, S., Dapice, M. y Reese, T. S.** (1988). Effects of mot gene expression on the structure of the flagellar motor. *J. Mol. Biol.* **202**, 575–584.
- Kim, S.-K. y Lee, J.-H.** (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* **54**, 71–85.
- Kim, S. M., Park, J. H., Lee, H. S., Kim, W. B., Ryu, J. M., Han, H. J. y Choi, S. H.** (2013). LuxR homologue SmcR is essential for *Vibrio vulnificus* pathogenesis and biofilm detachment, and its expression is induced by host cells. *Infect. Immun.* **81**, 3721–3730.
- Kirkpatrick, C. L. y Viollier, P. H.** (2012). Cell Polarity: ParA-logs Gather around the Hub. *Current Biology* **22**, R1055–R1057.
- Kjelleberg, S., Barraud, N. y Rice, S. A.** (2015). Dispersal from Microbial Biofilms. In *Microbial Biofilms, 2nd Edition* (ed. Mukherjee, P. K., Ghannoum, M., Whiteley, M., and Parsek, M.), pp. 343–362. American Society of Microbiology.
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J.-U. y Tolker-Nielsen, T.** (2006). Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 1–11.
- Kleiner, D., Paul, W. y Merrick, M. J.** (1988). Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1779–1784.
- Klose, K. E. y Mekalanos, J. J.** (1998). Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol. Microbiol.* **28**, 501–520.
- Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J. L. y Timmis, K. N.** (1989). Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J Bacteriol* **171**, 4326–4333.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. y Losick, R.** (2010). D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science* **328**, 627–629.

Referencias

- Kondo, S., Homma, M. y Kojima, S.** (2017). Analysis of the GTPase motif of FlhF in the control of the number and location of polar flagella in *Vibrio alginolyticus*. *Biophys Physicobiol* **14**, 173–181.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. y Peterson, K. M.** (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. y Aizawa, S.** (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **226**, 433–446.
- Kusumoto, A., Kamisaka, K., Yakushi, T., Terashima, H., Shinohara, A. y Homma, M.** (2006). Regulation of polar flagellar number by the *flhF* and *flhG* genes in *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem.* **139**, 113–121.
- Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T. y Homma, M.** (2008). Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**, 1390–1399.
- Kusumoto, A., Nishioka, N., Kojima, S. y Homma, M.** (2009). Mutational analysis of the GTP-binding motif of FlhF which regulates the number and placement of the polar flagellum in *Vibrio alginolyticus*. *J. Biochem.* **146**, 643–650.
- Kutsukake, K. y Iino, T.** (1994). Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol* **176**, 3598–3605.
- Kutsukake, K., Ohya, Y. y Iino, T.** (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 741–747.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R. y Lasa, I.** (2006). Biofilm-associated proteins. *C. R. Biol.* **329**, 849–857.
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L. y McAdams, H. H.** (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *PNAS* **99**, 4632–4637.
- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E. y Klose, K. E.** (2004). The Sodium-Driven Flagellar Motor Controls Exopolysaccharide Expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **186**, 4864–4874.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. y Caldwell, D. E.** (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **173**, 6558–6567.
- Lee, S. F., Li, Y. H. y Bowden, G. H.** (1996). Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect. Immun.* **64**, 1035–1038.

- Lee, S.-Y., De La Torre, A., Yan, D., Kustu, S., Nixon, B. T. y Wemmer, D. E. (2003). Regulation of the transcriptional activator NtrC1: structural studies of the regulatory and AAA+ ATPase domains. *Genes Dev.* **17**, 2552–2563.
- Lemos, J. A. C., Brown, T. A. y Burne, R. A. (2004). Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **72**, 1431–1440.
- Léonard, S., Ferooz, J., Haine, V., Danese, I., Fretin, D., Tibor, A., Walque, S. de, Bolle, X. D. y Letesson, J.-J. (2007). FtcR Is a New Master Regulator of the Flagellar System of *Brucella melitensis* 16M with Homologs in *Rhizobiaceae*. *Journal of Bacteriology* **189**, 131–141.
- Levitt, M. (1978). How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 640–644.
- Li, M. y Hazelbauer, G. L. (2004). Cellular Stoichiometry of the Components of the Chemotaxis Signaling Complex. *Journal of Bacteriology* **186**, 3687–3694.
- Li, C., Louise, C. J., Shi, W. y Adler, J. (1993). Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 2229–2235.
- Lister, J. L. y Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**,.
- Liu, X. y Matsumura, P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* **176**, 7345–7351.
- Lo, Y.-L., Chen, C.-L., Shen, L., Chen, Y.-C., Wang, Y.-H., Lee, C.-C., Wang, L.-C., Chuang, C.-H., Janapatla, R. P., Chiu, C.-H., et al. (2018). Characterization of the role of global regulator FliA in the pathophysiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Res. Microbiol.* **169**, 135–144.
- Loeschcke, A. y Thies, S. (2015). *Pseudomonas putida*-a versatile host for the production of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 6197–6214.
- López-Sánchez, A., Leal-Morales, A., Jiménez-Díaz, L., Platero, A. I., Bardallo-Pérez, J., Díaz-Romero, A., Acemel, R. D., Illán, J. M., Jiménez-López, J. y Govantes, F. (2016). Biofilm formation-defective mutants in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* **363**,.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 539–562.
- Macnab, R. M. (2003). How Bacteria Assemble Flagella. *Annual Review of Microbiology* **57**, 77–100.
- Macnab, R. M. (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1694**, 207–217.
- Manson, M. D., Tedesco, P., Berg, H. C., Harold, F. M. y Van der Drift, C. (1977). A protonmotive force drives bacterial flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3060–3064.

Referencias

- Gaca, A. O., Colomer-Winter, C. y Lemos, J. A.** (2015). Many Means to a Common End: the Intricacies of (p)ppGpp Metabolism and Its Control of Bacterial Homeostasis. *J Bacteriol* **197**, 1146–1156.
- Mao, F., Dam, P., Chou, J., Oلمان, V. y Xu, Y.** (2009). DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res.* **37**, D459-463.
- Marqués, S., Gallegos, M. T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K. N. y Ramos, J. L.** (1998). Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **180**, 2889–2894.
- Martínez-Argudo, I., Little, R., Shearer, N., Johnson, P. y Dixon, R.** (2004). The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals. *Journal of Bacteriology* **186**, 601–610.
- Martínez-García, E. y de Lorenzo, V.** (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **13**, 2702–2716.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Chavarría, M. y Lorenzo, V. de** (2013). The metabolic cost of flagellar motion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **16**, 291–303.
- Martínez-García, E., Aparicio, T., de Lorenzo, V. y Nikel, P. I.** (2014a). New Transposon Tools Tailored for Metabolic Engineering of Gram-Negative Microbial Cell Factories. *Front Bioeng Biotechnol* **2**,.
- Martínez-García, E., Nikel, P. I., Aparicio, T. y de Lorenzo, V.** (2014b). *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. *Microb Cell Fact* **13**,.
- Martínez-Gil, M., Yousef-Coronado, F. y Espinosa-Urgel, M.** (2010). LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* **77**, 549–561.
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R. y Martín, M.** (2012). The Gac-Rsm and SadB Signal Transduction Pathways Converge on AlgU to Downregulate Motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLOS ONE* **7**, e31765.
- Matilla, M. A., Ramos, J. L., Duque, E., Alché, J. de D., Espinosa-Urgel, M. y Ramos-González, M. I.** (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **9**, 1842–1850.
- Matilla, M. A., Travieso, M. L., Ramos, J. L. y Ramos-González, M. I.** (2011). Cyclic diguanylate turnover mediated by the sole GGDEF/EAL response regulator in *Pseudomonas putida*: its role in the rhizosphere and an analysis of its target processes. *Environ. Microbiol.* **13**, 1745–1766.

- Matsuyama, T. y Nakagawa, Y.** (1996). Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *Journal of Microbiological Methods* **25**, 165–175.
- Matsuyama, B. Y., Krasteva, P. V., Baraquet, C., Harwood, C. S., Sondermann, H. y Navarro, M. V. A. S.** (2016). Mechanistic insights into c-di-GMP–dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E209–E218.
- McCarter, L. L.** (2004). Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 18–29.
- McCarter, L., Hilmen, M. y Silverman, M.** (1988). Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* **54**, 345–351.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. y Kjelleberg, S.** (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 39–50.
- McMurry, J. L., Van Arnem, J. S., Kihara, M. y Macnab, R. M.** (2004). Analysis of the cytoplasmic domains of *Salmonella* FlhA and interactions with components of the flagellar export machinery. *J. Bacteriol.* **186**, 7586–7592.
- Mears, P. J., Koirala, S., Rao, C. V., Golding, I. y Chemla, Y. R.** (2014). *Escherichia coli* swimming is robust against variations in flagellar number. *eLife* **3**,.
- Merighi, M., Lee, V. T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. y Lory, S.** (2007). The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **65**, 876–895.
- Merrick, M. J.** (1993). In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (sigma N). *Mol. Microbiol.* **10**, 903–909.
- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. [Cold Spring Harbor, N.Y.]: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mills, E., Pultz, I. S., Kulasekara, H. D. y Miller, S. I.** (2011). The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell. Microbiol.* **13**, 1122–1129.
- Minamino, T., Imada, K. y Namba, K.** (2008). Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* **4**, 1105–1115.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M. C., García, J. M., Wyke, L. y Ramos, J. L.** (2000). Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 315–321.
- Monds, R. D. y O'Toole, G. A.** (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* **17**, 73–87.

Referencias

- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K. T., Macnab, R. M. y Namba, K.** (2006). The Type III Flagellar Export Specificity Switch is Dependent on FliK Ruler and a Molecular Clock. *Journal of Molecular Biology* **359**, 466–477.
- Munson, G. P. y Scott, J. R.** (2000). Rns, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol. Microbiol.* **36**, 1391–1402.
- Murat, D., Hérissé, M., Espinosa, L., Bossa, A., Alberto, F. y Wu, L.-F.** (2015). Opposite and Coordinated Rotation of Amphitrichous Flagella Governs Oriented Swimming and Reversals in a Magnetotactic *Spirillum*. *J Bacteriol* **197**, 3275–3282.
- Murray, T. S. y Kazmierczak, B. I.** (2006). FlhF Is Required for Swimming and Swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **188**, 6995–7004.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M. y Kutsukake, K.** (1999). Peptidoglycan-Hydrolyzing Activity of the FlgJ Protein, Essential for Flagellar Rod Formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 1555–1561.
- Navarrete, B., Leal-Morales, A., Serrano-Ron, L., Sarrió, M., Jiménez-Fernández, A., Jiménez-Díaz, L., López-Sánchez, A. y Govantes, F.** (2019). Transcriptional organization, regulation and functional analysis of flhF and fleN in *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* **14**, e0214166.
- Navarro, M. V. A. S., Newell, P. D., Krasteva, P. V., Chatterjee, D., Madden, D. R., O'Toole, G. A. y Sondermann, H.** (2011). Structural Basis for c-di-GMP-Mediated Inside-Out Signaling Controlling Periplasmic Proteolysis. *PLoS Biology* **9**, e1000588.
- Newell, P. D., Boyd, C. D., Sondermann, H. y O'Toole, G. A.** (2011). A c-di-GMP Effector System Controls Cell Adhesion by Inside-Out Signaling and Surface Protein Cleavage. *PLoS Biology* **9**, e1000587.
- Nie, H., Xiao, Y., Liu, H., He, J., Chen, W. y Huang, Q.** (2017). FleN and FleQ play a synergistic role in regulating lapA and bcs operons in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep* **9**, 571–580.
- Nielsen, L., Li, X. y Halverson, L. J.** (2011). Cell-cell and cell-surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions. *Environ. Microbiol.* **13**, 1342–1356.
- Nikel, P. I., Martínez-García, E. y de Lorenzo, V.** (2014). Biotechnological domestication of *pseudomonads* using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 368–379.
- Nilsson, M., Chiang, W.-C., Fazli, M., Gjermansen, M., Givskov, M. y Tolker-Nielsen, T.** (2011). Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability. *Environ. Microbiol.* **13**, 1357–1369.

- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J. y Gallegos, M.T.** (2015). FleQ Coordinates Flagellum-Dependent and -Independent Motilities in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7533–7545.
- Nogales, J., Gudmundsson, S., Duque, E., Ramos, J. L. y Palsson, B. O.** (2017). Expanding The Computable Reactome In *Pseudomonas putida* Reveals Metabolic Cycles Providing Robustness. *bioRxiv* 139121.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H. y Lino, T.** (1992). A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol. Microbiol.* **6**, 3149–3157.
- Oku, S., Komatsu, A., Tajima, T., Nakashimada, Y. y Kato, J.** (2012). Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes Environ.* **27**, 462–469.
- Opoku-Temeng, C. y Sintim, H. O.** (2017). Targeting c-di-GMP Signaling, Biofilm Formation, and Bacterial Motility with Small Molecules. *Methods Mol. Biol.* **1657**, 419–430.
- Osterman, I. A., Dikhtyar, Yu. Yu., Bogdanov, A. A., Dontsova, O. A. y Sergiev, P. V.** (2015). Regulation of flagellar gene expression in Bacteria. *Biochemistry Moscow* **80**, 1447–1456.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C. H., Au, T., Keyhan, M. y Matin, A.** (2000). The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* **36**, 414–423.
- Pérez-Martín, J., Timmis, K. N. y de Lorenzo, V.** (1994). Co-regulation by bent DNA. Functional substitutions of the integration host factor site at σ^{54} -dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J. Biol. Chem.* **269**, 22657–22662.
- Platero, A. I., García-Jaramillo, M., Santero, E. y Govantes, F.** (2012). Transcriptional Organization and Regulatory Elements of a *Pseudomonas* sp. Strain ADP Operon Encoding a LysR-Type Regulator and a Putative Solute Transport System. *J Bacteriol* **194**, 6560–6573.
- Platt, R., Drescher, C., Park, S. K. y Phillips, G. J.** (2000). Genetic system for reversible integration of DNA constructs and *lacZ* gene fusions into the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* **43**, 12–23.
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., dos Santos, V. M. y Wittmann, C.** (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 2279–2290.
- Prouty, M. G., Correa, N. E. y Klose, K. E.** (2001). The novel σ^{54} - and σ^{28} -dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **39**, 1595–1609.

Referencias

- Ptacin, J. L., Lee, S. F., Garner, E. C., Toro, E., Eckart, M., Comolli, L. R., Moerner, W. E. y Shapiro, L.** (2010). A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nature Cell Biology* **12**, 791–798.
- Pultz, I. S., Christen, M., Kulasekara, H. D., Kennard, A., Kulasekara, B. y Miller, S. I.** (2012). The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol. Microbiol.* **86**, 1424–1440.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W. J. y Stoodley, P.** (2005). Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology* **151**, 1569–1576.
- Quon, K. C., Marczynski, G. T. y Shapiro, L.** (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83–93.
- Rappas, M., Bose, D. y Zhang, X.** (2007). Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} -dependent gene transcription. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 110–116.
- Reitzer, L. J. y Magasanik, B.** (1986). Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**, 785–792.
- Reitzer, L. J., Movsas, B. y Magasanik, B.** (1989). Activation of *glnA* transcription by nitrogen regulator I (NRI)-phosphate in *Escherichia coli*: evidence for a long-range physical interaction between NRI-phosphate and RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **171**, 5512–5522.
- Ren, F., Lei, T., Song, Z., Yu, T., Li, Q., Huang, J. y Jiao, X.-A.** (2018). Could FlhF be a key element that controls *Campylobacter jejuni* flagella biosynthesis in the initial assembly stage? *Microbiol. Res.* **207**, 240–248.
- Renier, S., Hébraud, M. y Desvaux, M.** (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environ. Microbiol.* **13**, 835–850.
- Rinaudi, L. V. y Giordano, W.** (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**, 1–11.
- Ringgaard, S., Schirner, K., Davis, B. M. y Waldor, M. K.** (2011). A family of ParA-like ATPases promotes cell pole maturation by facilitating polar localization of chemotaxis proteins. *Genes Dev* **25**, 1544–1555.
- Ringgaard, S., Yang, W., Alvarado, A., Schirner, K. y Briegel, A.** (2018). Chemotaxis Arrays in *Vibrio* Species and Their Intracellular Positioning by the ParC/ParP System. *Journal of Bacteriology* **200**, e00793-17.
- Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. y Ramphal, R.** (1995). Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect. Immun.* **63**, 4868–4876.

- Rodríguez-Herva, J. J., Duque, E., Molina-Henares, M. A., Navarro-Avilés, G., Dillewijn, P. V., Torre, J. D. L., Molina-Henares, A. J., Campa, A. S. L., Ran, F. A., Segura, A., et al. (2010). Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 373–380.
- Rojo, F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 145–151.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., et al. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279–281.
- Rossmann, F., Brenzinger, S., Knauer, C., Dörrich, A. K., Bubendorfer, S., Ruppert, U., Bange, G. y Thormann, K. M. (2015). The role of FlhF and HubP as polar landmark proteins in *Shewanella putrefaciens* CN-32. *Molecular Microbiology* **98**, 727–742.
- Ryjenkov, D. A., Simm, R., Römling, U. y Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J. Biol. Chem.* **281**, 30310–30314.
- Sallai, L. y Tucker, P. A. (2005). Crystal structure of the central and C-terminal domain of the σ^{54} -activator ZraR. *J. Struct. Biol.* **151**, 160–170.
- Salveti, S., Ghelardi, E., Celandroni, F., Ceragioli, M., Giannesi, F. y Senesi, S. (2007). FlhF, a signal recognition particle-like GTPase, is involved in the regulation of flagellar arrangement, motility behaviour and protein secretion in *Bacillus cereus*. *Microbiology* **153**, 2541–2552.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T. y Hill, J. E. (2015). *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 17–46.
- Sand, W. y Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* **157**, 49–56.
- Sands, M. K. y Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **63**, 505–511.
- Santero, E., Hoover, T. R., North, A. K., Berger, D. K., Porter, S. C. y Kustu, S. (1992). Role of integration host factor in stimulating transcription from the σ^{54} -dependent *nifH* promoter. *Journal of Molecular Biology* **227**, 602–620.
- Santos, V. A. P. M. D., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M. y Timmis, K. N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **6**, 1264–1286.

Referencias

- Sarand, I., Österberg, S., Holmqvist, S., Holmfeldt, P., Skärfstad, E., Parales, R. E. y Shingler, V.** (2008). Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **10**, 1320–1334.
- Sarkar, M. K., Paul, K. y Blair, D.** (2010). Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 9370–9375.
- Sauer, K. y Camper, A. K.** (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* **183**, 6579–6589.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. y Davies, D. G.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *J. Bacteriol.* **184**, 1140–1154.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676.
- Schirmer, T. y Jenal, U.** (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 724–735.
- Schniederberend, M., Abdurachim, K., Murray, T. S. y Kazmierczak, B. I.** (2013). The GTPase Activity of FlhF Is Dispensable for Flagellar Localization, but Not Motility, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **195**, 1051–1060.
- Schuhmacher, J. S., Rossmann, F., Dempwolff, F., Knauer, C., Altegoer, F., Steinchen, W., Dörrich, A. K., Klingl, A., Stephan, M., Linne, U., et al.** (2015a). MinD-like ATPase FlhG effects location and number of bacterial flagella during C-ring assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 3092–3097.
- Schuhmacher, J. S., Thormann, K. M. y Bange, G.** (2015b). How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 812–822.
- Schulz, T., Rydzewski, K., Schunder, E., Holland, G., Bannert, N. y Heuner, K.** (2012). FliA expression analysis and influence of the regulatory proteins RpoN, FleQ and FliA on virulence and *in vivo* fitness in *Legionella pneumophila*. *Arch. Microbiol.* **194**, 977–989.
- Semmler, A. B., Whitchurch, C. B., Leech, A. J. y Mattick, J. S.** (2000). Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146 (Pt 6)**, 1321–1332.
- Shi, W., Li, C., Louise, C. J. y Adler, J.** (1993). Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 2236–2240.
- Shibata, S., Takahashi, N., Chevance, F. F. V., Karlinsey, J. E., Hughes, K. T. y Aizawa, S.-I.** (2007). FliK regulates flagellar hook length as an internal ruler. *Mol. Microbiol.* **64**, 1404–1415.

- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. y Römling, U.** (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology* **53**, 1123–1134.
- Smith, T. G. y Hoover, T. R.** (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Adv. Appl. Microbiol.* **67**, 257–295.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. y Bertin, P.** (1999). Multiple Control of Flagellum Biosynthesis in *Escherichia coli*: Role of H-NS Protein and the Cyclic AMP-Catabolite Activator Protein Complex in Transcription of the *flhDC* Master Operon. *J Bacteriol* **181**, 7500–7508.
- Soutourina, O. A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Hommais, F., Danchin, A. y Bertin, P. N.** (2002). Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 1543–1551.
- Srivastava, D., Hsieh, M.-L., Khataokar, A., Neiditch, M. B. y Waters, C. M.** (2013). Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **90**, 1262–1276.
- Steinberger, R. E. y Holden, P. A.** (2005). Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5404–5410.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. y Costerton, J. W.** (2002a). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S. y Klapper, I.** (2002b). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotech* **29**, 361–367.
- Studier, F. W. y Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113–130.
- Sudarsan, N., Lee, E. R., Weinberg, Z., Moy, R. H., Kim, J. N., Link, K. H. y Breaker, R. R.** (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**, 411–413.
- Sugisaki, K., Hanawa, T., Yonezawa, H., Osaki, T., Fukutomi, T., Kawakami, H., Yamamoto, T. y Kamiya, S.** (2013). Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **159**, 1379–1389.
- Szeto, T. H., Rowland, S. L., Rothfield, L. I. y King, G. F.** (2002). Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15693–15698.

Referencias

- Takekawa, N., Kwon, S., Nishioka, N., Kojima, S. y Homma, M.** (2016). HubP, a Polar Landmark Protein, Regulates Flagellar Number by Assisting in the Proper Polar Localization of FlhG in *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **198**, 3091–3098.
- Tart, A. H., Blanks, M. J. y Wozniak, D. J.** (2006). The AlgT-Dependent Transcriptional Regulator AmrZ (AlgZ) Inhibits Flagellum Biosynthesis in Mucoid, Nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates. *Journal of Bacteriology* **188**, 6483–6489.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Thompson, S. R., Wadhams, G. H. y Armitage, J. P.** (2006). The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8209–8214.
- Thormann, K. M. y Paulick, A.** (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**, 1275–1283.
- Tischler, A. D. y Camilli, A.** (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* **53**, 857–869.
- Toutain, C. M., Zegans, M. E. y O'Toole, G. A.** (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 771–777.
- Travers, A. y Muskhelishvili, G.** (2005). DNA supercoiling — a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 157–169.
- Tschowri, N., Schumacher, M. A., Schlimpert, S., Chinnam, N. babu, Findlay, K. C., Brennan, R. G. y Buttner, M. J.** (2014). Tetrameric c-di-GMP Mediates Effective Transcription Factor Dimerization to Control *Streptomyces* Development. *Cell* **158**, 1136–1147.
- Tso, W.-W. y Adler, J.** (1974). Negative Chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **118**, 560–576.
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Sousa, E. H. S., Wan, X., Saito, J. A., Alam, M. y Gilles-Gonzalez, M.-A.** (2009). An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* **48**, 9764–9774.
- Ude, S., Arnold, D. L., Moon, C. D., Timms-Wilson, T. y Spiers, A. J.** (2006). Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology* **8**, 1997–2011.
- Valls, M., Silva-Rocha, R., Cases, I., Muñoz, A. y de Lorenzo, V.** (2011). Functional analysis of the integration host factor site of the σ^{54} Pu promoter of *Pseudomonas putida* by *in vivo* UV imprinting. *Molecular Microbiology* **82**, 591–601.
- van Amsterdam, K. y van der Ende, A.** (2004). *Helicobacter pylori* HP1034 (ylxH) is required for motility. *Helicobacter* **9**, 387–395.

- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. y Kolter, R.** (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev.* **22**, 945–953.
- Wang, Y., Li, Y., Wang, J. y Wang, X.** (2018). FleQ regulates both the type VI secretion system and flagella in *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **65**, 419–427.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. y Kjelleberg, S.** (2003a). Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J Bacteriol* **185**, 4585–4592.
- Webb, J. S., Givskov, M. y Kjelleberg, S.** (2003b). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 578–585.
- Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J. W., Prüß, B. M., Babitzke, P. y Romeo, T.** (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **40**, 245–256.
- Weinberg, Z., Barrick, J. E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J. N., Gore, J., Wang, J. X., Lee, E. R., Block, K. F., Sudarsan, N., et al.** (2007). Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic Acids Res* **35**, 4809–4819.
- Weinhouse, H., Sapir, S., Amikam, D., Shilo, Y., Volman, G., Ohana, P. y Benziman, M.** (1997). c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett.* **416**, 207–211.
- Whitchurch, C. B.** (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* **295**, 1487–1487.
- Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R. y Howell, P. L.** (2012). Structure of the Cytoplasmic Region of PelD, a Degenerate Diguanylate Cyclase Receptor That Regulates Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **287**, 23582–23593.
- Wigneswaran, V., Nielsen, K. F., Sternberg, C., Jensen, P. R., Folkesson, A. y Jelsbak, L.** (2016). Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* **15**,.
- Wikström, P., O'Neill, E., Ng, L. C. y Shingler, V.** (2001). The regulatory N-terminal region of the aromatic-responsive transcriptional activator DmpR constrains nucleotide-triggered multimerization. Edited by J. Karn. *Journal of Molecular Biology* **314**, 971–984.
- Wilson, T. J., Maroudas, P., Howlett, G. J. y Davidson, B. E.** (1994). Ligand-induced Self-association of the *Escherichia coli* Regulatory Protein TyrR. *Journal of Molecular Biology* **238**, 309–318.
- Wingender, J., Neu, T. R. y Flemming, H.-C. eds.** (1999). *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Referencias

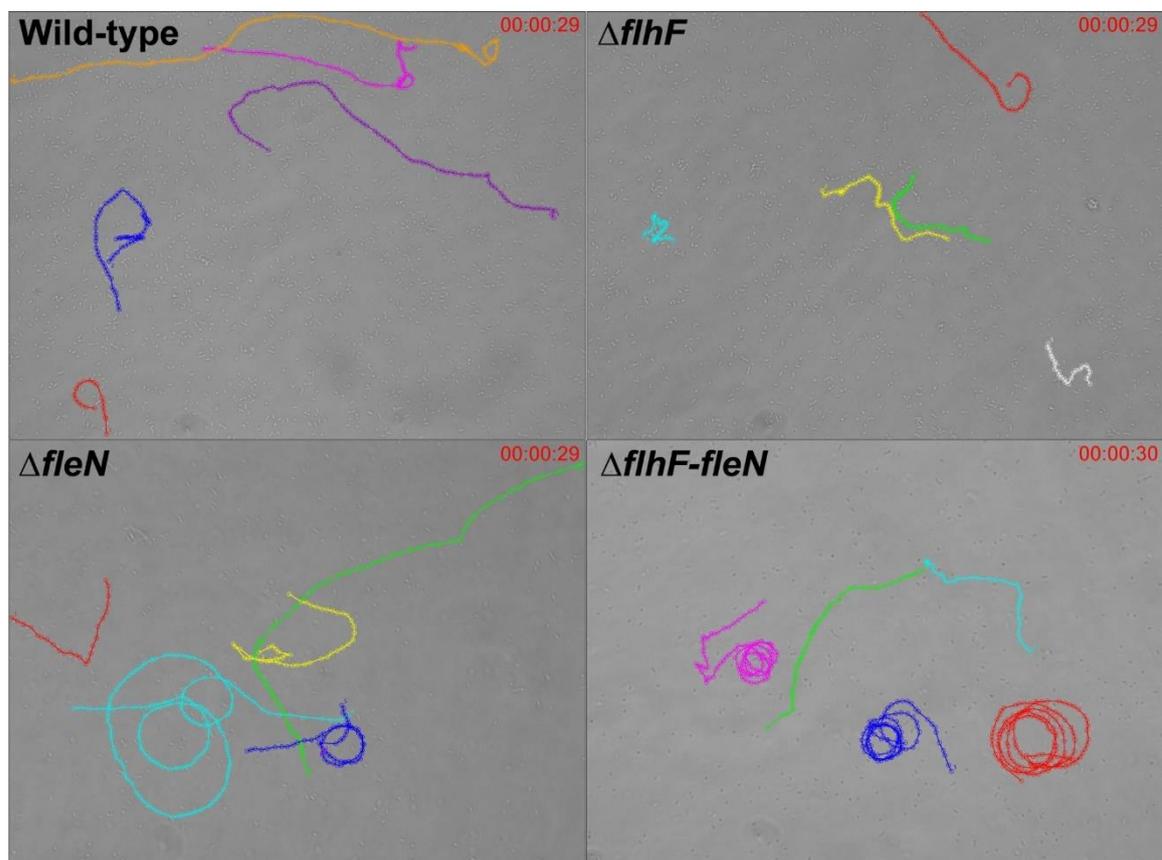
- Wingender, J., J., K.** (2002). *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 6 Volume Set. Wiley.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A. y Brinkman, F. S. L.** (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646-653.
- Wirebrand, L., Österberg, S., López-Sánchez, A., Govantes, F. y Shingler, V.** (2018). PP4397/FlgZ provides the link between PP2258 c-di-GMP signalling and altered motility in *Pseudomonas putida*. *Sci Rep* **8**,.
- Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Rudnicka, Z. y Markowska, K.** (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *J Appl Genet* **57**, 225–238.
- Wyman, C., Rombel, I., North, A. K., Bustamante, C. y Kustu, S.** (1997). Unusual Oligomerization Required for Activity of NtrC, a Bacterial Enhancer-Binding Protein. *Science* **275**, 1658–1661.
- Xiao, Y., Nie, H., Liu, H., Chen, W. y Huang, Q.** (2016). Expression of the diguanylate cyclase GcbA is regulated by FleQ in response to cyclic di-GMP in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep* **8**, 993–1002.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. y McFeters, G. A.** (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4035–4039.
- Yamaguchi, S., Aizawa, S., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C. J. y Macnab, R. M.** (1986). Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**, 1172–1179.
- Yamaichi, Y., Bruckner, R., Ringgaard, S., Möll, A., Cameron, D. E., Briegel, A., Jensen, G. J., Davis, B. M. y Waldor, M. K.** (2012). A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev.* **26**, 2348–2360.
- Yamamoto, S. y Kutsukake, K.** (2006). FliT acts as an anti-FliH/D2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **188**, 6703–6708.
- Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M. y Tolker-Nielsen, T.** (2007). Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **153**, 1318–1328.
- Zähringer, F., Lacanna, E., Jenal, U., Schirmer, T. y Boehm, A.** (2013). Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure* **21**, 1149–1157.
- Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T. S. y Khan, S.** (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **261**, 195–208.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. y Römling, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology* **39**, 1452–1463.

Anexos

Anexo I. Seguimiento de la trayectoria en medio líquido de la estirpe silvestre KT2442 y diferentes mutantes

El anexo I muestra las trayectorias seguidas por células de la estirpe silvestre y los mutantes $\Delta flhF$, $\Delta fleN$ y $\Delta flhF \Delta fleN$ en medio líquido LB. Se monitorizó la trayectoria de 5 células individuales en cada una de las estirpes durante 30 segundos. Las trayectorias se generaron gracias a la herramienta MtrackJ incluida en el software de análisis de imagen ImageJ.



Anexo II. Alineamiento de los promotores flagelares en diferentes especies de *Pseudomonas*.

El anexo II muestra el alineamiento de las 23 regiones promotoras contenidas en el clúster flagelar de 7 especies de *Pseudomonas*. En color rojo se muestra la secuencia consenso reconocida por los factores σ^{28} (FliA) y σ^{54} en las diferentes regiones promotoras. En verde, la secuencia consenso reconocida por σ^{70} . En color azul se muestran aquellas secuencias que forman parte de la región codificante del gen aguas arriba del promotor correspondiente, incluyendo el codón de parada resaltado en negrita en caso de que aparezca. La lista de especies cuyas regiones promotoras han sido alineadas es: *P. putida* KT2440 (Ppu KT2440), *P. putida* F1 (Ppu F1), *P. syringae* pv. tomato DC3000 (Psy DC3000), *P. syringae* pv. syringae B728a (Psy B728a), *P. syringae* pv. phaseolicola 1448a (Psy 1448a), *P. fluorescens* SBW25 (Pfl SBW25) y *P. protegens* Pf-5 (Ppr Pf-5).

PfliK2

Ppu KT2440
TATCTTCAGTAGGGCTTTGAAGCAGCCAACACCGCTCCAGAACCCTTGTGTC**TCAAGTC**GCCCCGCGCGCT**GCCGTTATA**CTGGCAACCA
Ppu F1
AGGAGCGGGTTACCCCGCAAGCAGCCAACATCGCTCCAGAACCCTTGTGTC**TCAAGTC**GCCCCGCGCGCT**GCCGTTATA**CTGGCAACCA
Psy DC3000
CTGTTGCGTCGCGAAATGTGTCAAAACAGACACATACGGAGTAAAGACGGT**TCAAGTC**AGGATTGATGCA**GCCGTTACA**TGAAGAGAAC
Psy B728a
GTTTTCGCTCGCGAAATGTGCCAAAACAGACACATACGGAGTAAAGACGGT**TCAAGTC**GGGGTTGATAC**GCCGTTACA**TGAAGAGAAG
Psy 1448a
CTGGAGCGTCGCGAAATGTACAAAACAGACACATACGGAGTAAAGACGGT**TCAAGTC**GGGGTTGATAT**GCCGTTACA**TGAAGAGAAG
Pfl SBW25
GCGCTATGGCTTCAAGAAGAGGGCTGGTCAAAAGATCGCGGGCCTTACGGT**TCAAGTC**GGCGGTGCAGCG**GCCGTTAAA**GAGAAATGCA
Ppr Pf-5
TGCTACGGCTTCGAGAAGAGGGCTGGTCAAGGATAGCGGGCCTTACAGGT**TCAAGTC**GGCAACGGAGCG**GCCGTTAAA**GAGATGCAGG
Consenso FliA **TcAAgNw** **-N₁₂₋₁₃-** **gcCGAtaNc**

PparC

Ppu KT2440
TGCGCCGAGCCTGACCGGCTCGGGCAGCGCCAATGCCACACCGGATGCCGATTCGCGCCGGC**TGGCACACAAA****GTGCA**CCGGCAATAC
Ppu F1
TGCGCCGAGCCTGACAGGCTCGGGCAGCGCCAATGCCACACCGGATGCCGATTCGCGCGTGC**TGGCACACAAA****GTGCA**CCGGCAATAC
Psy DC3000
TTCGCGCAGCCTGACCGGTTCCGGCAGCGCCAATGCCAGCCCGACGCTGCATTACGCGTGC**TGGCACACAAA****CTGCA**CCGGTCCAG
Psy B728a
TTCGCGCAGCCTGACCAGCGCCGGATCAGCCAATGTGCAGCCGGATGCTGCATTGCGCGTGC**TGGCACACAAA****CTGCA**CCGGTCCAG
Psy 1448a
TGCGTTCGAGCCTGACAGTTCAGGGTTCGGCCAATGTGCAACCGGATGCTGCACTGAGGCGTGC**TGGCACACAAA****CTGCA**CCGGTCCAG
Pfl SBW25
TACGCGCAGCCTGACCGGCACGGCACCGCCAATGCAACACCGGATGCCGCTTGAAGCGGGC**TGGCACACAAA****CTGCA**CCGGCCCTG
Ppr Pf-5
TGCGCCGAGCCTGACCGGTACCGGCACCGCCCATGCAACACCGGATGCCGCACTCAAGCGTGC**TGGCACACAAA****CTGCA**CCAACCCCGG
Consenso σ^{54} **TGGCAC** **-N₅-** **TTGCw**

PfliH

Ppu KT2440
GGCGTCGGTCCTGGCAATCGAGGTTGTCTGCTGCCGACGCATTCGCGGGTGAACCCGCTCCTACA**AGGGAC**CGTGT**TGGCC**GAACATGGTT
Ppu F1
GGCGTCGGCCCTGGCAATCGAGGTTGTCTGCTGCCGACGCATTCGCGGGTGAACCCGCTCCTACA**AGGGAC**CGTGT**TGGCC**GAACATGGTT
Consenso σ^{54} **TGGCAC** **-N₅-** **TTGCw**

PcheA

Ppu KT2440
 ACCACGATCAATTGCGTGCAGAAAAAGATCGAGAAAAACATCCGACTCGGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAGCGTGAAGACG
 Ppu F1
 ACCACGATCAATTGCGTGCAGAAAAAGATCGAGAAAAACATCCGACTCGGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAGCGTGAAGACG
 Psy DC3000
 ACGAAGAATCCATCCTTGCTGAAAAAGATCCTAAAAAACATCTCGACAAGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAACGTGAAGACG
 Psy B728a
 ACGAACAATCCATCCTCAATGAAAAAGATCCTAAAAAACATCTCGCTCAGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAACGTGAAGACG
 Psy 1448a
 ACGAAGAATCCATCCTTGCTGAAAAAGATCCTAAAAAACATCTCGCCAAGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAACGTGAAGACG
 Pfl SBW25
 ACCGCGAAGCGATCCTCTCGGAAAAAGATCCACAAAAACATCTCGCCAAGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAACGTGAAGACG
 Ppr Pf-5
 ACCGTGAATCGATCCTCGCTGAAAAAGATCCGCAAAAACATCTCGCCAAGGGTGAAGGTCCGCAGATTCATGCCGATAAACGGGAAGACG
Consenso FliA TcAAgNw -N₁₂₋₁₃- gcCGAtaNc

PcheY

Ppu KT2440
 CCGGAGCGTGAGCGCCTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGTGAGGTGCTGGGTGT CAGCGAGTCCG
 Ppu F1
 CCGGAGCGTGAGCGCCTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGTGAGGTGCTGGGTGT CAGCGAGTCCG
 Psy DC3000
 CCAGAGCGCGAGCGCTCTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGAGAGGTCTTTGGTGT CAGCGAATCT
 Psy B728a
 CCAGAGCGTGAGCGCTCTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGAGAGGTCTTTGGGGT CAGCGAATCT
 Psy 1448a
 CCAGAGCGTGAGCGCTCTGGTCTTTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGAGAGGTCTTTGGGGT CAGCGAATCT
 Pfl SBW25
 CCGGAACGTGAGCGGTTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGTGAGGTCTTTGGGGT CAGCGAATCG
 Ppr Pf-5
 CCGGAGCGCGAGCGACTGGTGTGGCGCTGTACTACGACGAAGAGCTGAACCTCAAGGA AATCGGTGAGGTCTTTGGGGT CAGCGAATCG
Consenso FliA TcAAgNw -N₁₂₋₁₃- gcCGAtaNc

PflhF

Ppu KT2440
 GCCATCGTGCAAAGCATTTGTCGGCGTTGAGTCGGAGCTACCAGTGATTACCTGGAGCCAAGGTGGAAACAGATT TTGCTGAATAGTCTG
 Ppu F1
 GCCATCGTGCAAAGCATTTGTCGGCGTTGAGTCGGAGCTGCCAGTGATTACCTGGAGCCAAGGTGGAAACAGATT TTGCTGAATAGTCTG
 Psy DC3000
 GCAATCGTGCAAAGCATTTGAGGCGTTGAGCCGGAGCTGCCTGTTATCACTCTGGAACCAAGGTGGAAACAGATA TTGCTCAATAGTTTG
 Psy B728a
 GCAATCGTGCAAAGCATTTGAGGCGTTGAGCCGGAGCTGCCTGTTATCACTCTGGAGCCAAGGTGGAAACAGATA TTGCTCAATAGTTTG
 Psy 1448a
 GCAATCGTGCAAAGCATTTGAGGCGTTGAGCCGGAGCTGCCTGTTATCACTCTGGAACCAAGGTGGAAACAGATA TTGCTCAATAGTTTG
 Pfl SBW25
 GCAATCGTGCAAAGCATTTGAGGCGTTGACTCCGAGCTGCCTGTGATCACCTTGGAAACCAAGGTGGAAACAAATA TTGCTCAATAGTATT
 Ppr Pf-5
 GCCATCGTGCAAAGCATTTGAGGCACTGAGTCTGAGCTGCCTGTGATCACCTTGGAGCCAAGGTGGAAACAAATT TTGCTCAGCAGTCTG
Consenso σ⁵⁴ TGGCAC -N₅- TTGCw

PflhA

Ppu KT2440
 GAGCCACCGTCAACGCGGTGGTGTGCGCCGGTTTCATCTTTTCGTGTGGGTGTCTGCCAAAGTGGAAA GCTTCTTGCA AAGCCACGCC
 Ppu F1
 GAGCCATCAGCCAACGCGATGGAGTTCGCGCCGGTTTCATCTTTTCGTGTGGGTGTCTGCCAAAGTGGAAA GCTTCTTGCA AAGCCACGCC
 Psy DC3000
 CTGATCACCTCGTCTTGCGCAATTTCTACCTCTAAAGCCTTGCCGGCACTGGCTTTGTAAAAGTGGACA GCTTTTGCA ATAAGGTCTGA
 Psy B728a
 TCAGCGCACCGGATTTACGTGACTTCTGTGCCTAAAGCCTTACCGCCACTGGCTTTGTAAAAGTGGACA GATTTTGCA ACAGGGTCTGA
 Psy 1448a
 AAGGTATGCCGGTTTACATTGCTTCTGCCTTTAAAGCCTTACCAGCACTGGCTTTGTAAAAGTGGACA GCTTTTGCA ACAGGGTCTGA
 Pfl SBW25
 CAGCCAGCGGGAGCAAGCTCCCTCGCCACAGGTGCGACATGATCTGCGGCATGGGGCAAAAAGTGGAAAG GCTTCTTGCA ATACCGCCTG
 Ppr Pf-5
 GCCACTCTGAGGTTTCCGGCATTTCGGCTCAATGCCGGCGCCATATTTCTTTTCGGTAAAAGTGGAAAG GTTTCTTGCA GTAGCAGCCC
Consenso σ⁵⁴ TGGCAC -N₅- TTGCw

Anexo II

PfliL

Ppu KT2440
CGCGGGCGAGCCCCGGAAGAAGCCAGCACC GCAAAACCTGCTGGAATCCATCCCCTGCAAAATC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CAAGCCAAGC
Ppu F1
AGCGGGCGTGGCCGGAAGCAGCCAGCACC GCAAAACCTGCTGGAATCCATCCCCTGCAAAATC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CAAGCCAAGC
Psy DC3000
ATGTCCAGCGCCTGTCTCCGCGCGTAACCGTTTGTGTGATACATGCCCCCTCTCGTACAACCTC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CTTCTCTGT
Psy B728a
ACGATCCCTGCGGCCCTGGCGCGTAACCGTTTGTGTGATACATGCCCCCTCTCGTACAACCTC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CTGCCTCTGT
Psy 1448a
ACCATCCCTCCGCGCCCAGCCGCGTAACCGTTTGTGTGATACATGCCCCCTCTCGTACAACCTC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CTGCCTCTGT
Pfl SBW25
GGGGGCAAGCCCCCTCCACAATTTGACTTGCCGCGTCCGTACGTCCCCACTTCAGACAACCTC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CTTGCCTTTC
Ppr Pf-5
TGCACCCAGGTTTCCCTTCGCAGCGTTGCCCTTCGCTGTGATCCCTGCCTTTCTGACAAATC **TGGCAT** AACAC **TTGCT** CTTGCCTTTC
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGCw**

PfliK

Ppu KT2440
CGTCGTTGTGCAGCACTTTTACCGTGGT GAGCAGCAACGATATTTCCGCGAGGC **TGA** TACGCGAGT **TGGCGC** GAGTC **TTGCC** TGTCTCTGCC
Ppu F1
CGTCGTTGTGCAGCACTTTTACCGCGGT GAGCAGCAACGATATTTCCGCGAGGC **TGA** TACGCGAGT **TGGCGC** GAGTC **TTGCC** TGTCTCTGCC
Psy DC3000
TGCTGAGCGCCAGCTCTTTCATCAGT **TGA** TCGATAATGCCCTGTGCAAGGGCTGTATTTTAAAGT **TGGCCC** ACATA **TTGCT** ATGTCTTGT
Psy B728a
TGTTTCGTCATCTGA GCCCTTAGAGTCATACCCTCGATCCCCGCTATGGGGAATCATTAGATAAC **TGGCCC** GTATA **TTGCT** AACTATTTCC
Psy 1448a
ATCACTGATTTCCAGATCCCCGATCCTCCTTTATTCGGAACCTTTGAAGTGGGTGTGGAAGGT **TGGCCC** GCATA **TTGCT** CAGTGTCTCTG
Pfl SBW25
TGCTGGGGCGGACCCCGATCAGCCGTTACCACACAACGGATAGGTACCCGTAATAATCAAAACC **TGGCCC** AACTC **TTGCT** CTACCTCTAG
Ppr Pf-5
GCGAGCAGGAGCTGCAGCGCTTTTCATTTGTTGA GAAGCAGCTTTTTATCTCGGATTGATAAAGC **TGGCCC** GGCCT **TTGCA** GTCAAGTCTT
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGCw**

Phsba

Ppu KT2440
TGCCCCGGAAGAGGCCGGTACAGGCCATCAAAGCCATGAGCCTGCATCCGCT **TGCT** CCCCCACCATCGCC TGCT **TAAACC** TTAAAGCAG
Ppu F1
TTACCCGGAAGAGGCCGGTACAGGCCATCAAAGCCACGAGCCTGCATCCGCT **TGCT** CCCCCACCATCGCC TGCT **TAAACC** TTAGAGCAG
Psy DC3000
CGAACAATTTCTGA CGTTTCAATTAATCAGTCCCGGAGATCTTCCGGTCTGG **TCTACG** CTATTAATGTCTCGGTGA **TGAAAC** ACCTCGAGG
Psy B728a
AACAATTTCTGA CGTTTCAATCAGACCCGAGTATCTCTCTGGCTGG **TCTACG** CTATCAATGTCTCGGTGA **TGAAAC** ACCTCGAGG
Psy 1448a
AACAATTTCTGA CGTTTCAATCAGACCCGCGGTGATTTCTCTGGCTGG **TCTACG** CTATCAATGTCTCGGTGA **TGAAAC** ACCTCGAGG
Pfl SBW25
AGCCCGCTCACTACAAATAGTGCATAGCCACACACATTTGATGTGTGT **TGCCC** ATAGCCGGTTCACC TGCT **TAAACC** TTGTGTCTAT
Ppr Pf-5
CGCTTGCCCTCGTCAAGCCATACTGA TGGTGCTCAATTTGCCCGTGCGGG **TGTCC** CCCCCGCGAGTGGG TGCT **TAAACC** TTTTAGACG
 σ^{70} consensus **TTGACA -N₁₇₋₁₈- TATAaT**

PfliE

Ppu KT2440
CTATCGGACGCAAGGCCGCTCCCGCAGGAATTGTGTGATCTCTGGGAAATGAGTTGCGAAGGC **TGGCAC** CTTTG **TTGCT** TTAGGTAGGT
Ppu F1
CTATCGGACGCAAGGCCGCTCCCGCAGGAATTGTGTGATCCCTGGGAAATGAGTTGCGAAGGC **TGGCAC** CTTTG **TTGCT** TTAGGTAGGT
Psy DC3000
AGGGCGATTTGATGTCGGGCAACACGGCATTCTCGAGGGTGTGCCAAATGCCACTATCCAGC **TGGCAC** CGTTG **TTGCT** AAGTCTTCTG
Psy B728a
GGCGGAACTCGTGTCAAGCGACATGATGCACTCATCTGGTGTGGCAATAGCCGCCATCTAGC **TGGCAT** CGTTG **TTGCT** ATACCTTCTG
Psy 1448a
GGAGTGATTTTCATGTCGGGCAACATGGTATTTCCATTTGGTGTGGCAATAGCCGCCATCTAGC **TGGCAC** CGTTG **TTGCT** ATGTCTTCTG
Pfl SBW25
CGCCACATAA CTGGTAACAAGGTCGACAACCTTTGTGCCTTTTCTTACGAGTTGATCCAGAGC **TGGCAC** CCTTG **TTGCT** ACTTCCCTAG
Ppr Pf-5
GTTTCGCGACCTGA TCTGTGAGAGGCAAGCCGGATGGGCTTTTGTGATAAGGGCCATGGAGC **TGGCAC** CCTTG **TTGCT** AACACCTCAC
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGCw**

PfleS

Ppu KT2440
 AAAAATCACGGCGAACCCCTTCTCGGTCTTAACGCAATCCTACGTCAAACCCAAACCCCATCTC**CGGCAC**GGCTA**TTGCT**ACACCGCTGG
 Ppu F1
 CGGTTGCCTGTGCCGGCTTCTTCGCGGGCGTGCCCGCAAGAGGCCGGCACAAATCCCTATCTC**CGGCAC**GGCTA**TTGCT**ACATCGCTGG
 Psy DC3000
CGGAGGATTGACGCCTGTTTCAAACGCCAAAAATCAAGCCCTTGAATTTTCAAGGGTTTTTTTT**CGGCAC**GAGGA**TTGCT**AAGTCTCTCT
 Psy B728a
CAGATGATTGACGCCGGTTTTTTGTGCCAAAAACCAAGCCCTGATTTTTCAGGGGTTTTTTTT**AGGCAC**GGGGA**TTGCT**AAGTCTCTCT
 Psy 1448a
CAGATGATTGACGCCTGTCTGTAGCGCCAAAAATCAAGCCCTGAAATTTTCAGGGGTTTTTTTT**CGGCAC**GAGGA**TTGCA**AAGTCCCTCT
 Pfl SBW25
 GACGGCAACAGCCACTCGTCAAACGAAACTGTATTGGCGAGGCCGGGCACCTTGGTTTTTTTT**CGGCAC**AAGTA**TTGCT**ACAGCCCTCG
 Ppr Pf-5
GTGATGAACAGCCGGATGATTGACGCCGGTTTTTCAAGTCTTTGAAAACAGGGTGGTTTTTTTT**AGGCAC**GGGTA**TTGCT**AAGTCTCTTG
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGCw**

PfleQ

Ppu KT2440
 TGGGCAGAGAGCAACGCTTCGGCGCCATAAAT**TTGACT**GCCTTTAAGTTTT**TTGACTTTACT**AGTGGCTGTTTT**CGAATTT**CAGACGTCCG
 Ppu F1
 ACCGATGTTGCAAAAAGCCGTGCGCCATTAAT**TTGACT**GATCGGTGTTTT**TTGACTTTACT**AGTGGCTGTTTT**CGAATTT**CAGACGTCCG
 Psy DC3000
 TTTAATCCGTGCAAGAAGTTTTCCGCATAAAT**TTGACT**GTGTTGTTTT**TTGACTTTACT**AGTG ATGTTTACT**TATTTT**CTGGCGTCTC
 Psy B728a
 TTTTATTGTTGCAAGAATTTCCGCATAAAT**TTGACT**GTGTTGTTTT**TTGACTTTACT**AGTG ATGTTTACT**TATTTT**CTGGCGTCTC
 Psy 1448a
 TTTTATTGTTGCAAGAATTTCCGCATAAAT**TTGACT**GTGTTGTTTT**TTGACTTTACT**AGTG ATGTTTACT**TATTTT**CTGGCGTCTC
 Pfl SBW25
 GTCGCAGTTAATCCTACCGGTGCGTCATAAAT**TTGACC**GTGCCAGCTTTTT**TTGACTTTACT**AGTG CTGTTTT**CAGATTT**CAGACGTCTA
 Ppr Pf-5
 TGAGTTAATCCCGAACACTGCGCGCCATAAAT**TTGACT**GTGCACGCTTTTT**TTGACTTTACT**AGTGGCTGTTTT**CAGATTT**CAGCGGTCTA
Consenso σ^{70} **TTGACA -N₁₇₋₁₈- TATAaT**
Consenso σ^{70} **TTGACA -N₁₇₋₁₈- TATAaT**

PfliS

Ppu KT2440
GACGACCCTGAACGCGATGAACAAGGCCAATAACGACGACT**GA**TGGTCGTAT**TCAAGAT**CTTTGGGGCTAAG**CCGATCAC**TTAGGTATGT
 Ppu F1
 ATTGACAGCAGTATCAAGAACCCGACTTCGTGTGCGGTTCTTGCTTTTGGGC**TAAAGTT**TCTGCGCGATGC**GTCGATAGC**TTGAATATCA
 Psy DC3000
 ATTGACAGCAGTATCAAGAACCCGACTTCGTGTGCGGTTCTTGCTTTTGGGC**TAAAGTT**TCTGCGCGATGC**GTCGATAGC**TTGAATATCA
 Psy B728a
 CAGTGCAGAAGTACCAGGAACCCGACGCTGTGTCGGGTTCTTGCTTTTGGGC**TAAAGTT**TCCGCGCACTGC**GTCGATAGC**TTGAGTATCA
 Psy 1448a
 TTTTACAGAAGTATCAAGAACCCGACTCCGTGTGCGGTTCTTGCTTTTGGGC**TAAAGTT**TCTGCGCCATGC**GTCGATAGC**TTGAGTATCA
 Pfl SBW25
 AAAAGGCCAGACGGTTGTCTGGCCTTTTTTTTCTCTGGAGACGACTCGCGC**TAAAGCT**TTTTGCGAGCCA**GTCGACATA**TTGGTTACTG
 Ppr Pf-5
 GCGCCAAAAGCCCGCAGCGTTTTTTCAGCGCTCCGGGCTTTTGTATTGGCC**TAAAGTT**TTTTGACGTTGC**GTCGATATA**TTGCTTATAC
Consenso FliA **TcAAgNw -N₁₂₋₁₃- gcCGAtaNc**

PfliD

Ppu KT2440
CCTGAGCCTGGCTCGCAGTCTGGCGGAGGGTGATGGTTTTTACTTGATGACAATGT**GTAA**GT**TGGCAT**GAGTCT**TGACT**CGGATTGTG
 Ppu F1
GCATTGCGGATTGCGCATAACCTGAGCGATGTAACAGTATTTTGTTCGACGCCAAGGTTTGAT**CGGCGG**AGAAT**GTGCT**AAAGCAGGAA
 Psy DC3000
CTGAAACTGGCCGATAGCCTGAGTGATGCGAACAGCTTGTGTTCCGCGCCAGAGCGTGATCGCC**CGGTAC**GGTACT**TGTT**GCAGGTTGCC
 Psy B728a
CTGAAACTGGCCGATAGCCTGAGTGATGCGAACAGCTTGTGTTCCGCGCCAAGGCCTGATCGCC**CGGTAC**CGCAT**GTGTT**TCGGGTCAT
 Psy 1448a
CTGAAACTGGCCGATAGCCTGAGTGATGCGAACAGCTTGTGTTCCGCGCCAAGGCCTGATTGT**CAGTAC**GGTAT**TGTT**GCCGTTTTGC
 Pfl SBW25
CACTGAAGCTGGCACAGAACCTTTCCAGCGCAAGCCACCTGTTGTTTTCGACGACAAGGTCT**GAGCTGGCAT**GAAAA**TGTT**GCTGTCTATGT
 Ppr Pf-5
CTTAAACTGGCCAATAGCTTGAATGATGCGAGTAGTCTGTTGTTTCAGTGCCAAGGCCTGACAGCT**TGGCAT**GAAAA**TGTT**GCTGGTTACG
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGCw**

Anexo II

PfliC

Ppu KT2440
CTTGATTTCTCAGGGCTGGCCCCATGCCAGTATTTTTTTTTGAAAAACCC**TCAAGCA**ACCCGCGCACCC**GACGATAAC**CATTACGAAG
Ppu F1
CCTTGATTTTCATTGGACTGGCACGGTGCAGCAATTTTTTTTTGAAATTGCGC**TAAAGCA**AGACGCCCTGAC**GACGATAAC**TATTACGAAG
Psy DC3000
CCTTGTTTTTATAAGGGGTGGAGGAATGATGGCAAAATATTCAAAAAAACCGC**TCAAGCA**ACCTGCCATCGC**GACGATAAC**TATTACGAAG
Psy B728a
CCTTGTTTTTATAAGGGGTGTCACGATGATGGCAAAATATTAAAAAAAACAC**TCAAGCA**ACCTGCCATCGC**GACGATAAC**TATTACGAAG
Psy 1448a
CCTTGTTTTTATAAGGGGTACAGGCATGATGGCAAAATATTCAAAAAAACAC**TCAAGCA**ACCTGCCATCGC**GACGATAAC**TATTACGAAG
Pfl SBW25
CCTTGAATTACAAGGGGTGGCACGACGCCAGTAAATTTTTCAAAAAATCC**TCAAGCA**ACCGGCTACC**GACGATAAC**TATTACGTAG
Ppr Pf-5
CCTTGTTTTCCAAGGGATGGCCGGGTGATGGCAAAATTTTTGAAAAAGCCC**TAAAGCA**ACTTGCATTACC**GACGATAAC**TATTACGAAG
Consenso FliA **TcAAgNw** **-N₁₂₋₁₃-** **gcCGAtaNc**

PflgF

Ppu KT2440
CGACAACTGACGGTTATTGCCCTTGCCGCGCTGAAAGCCCCGTAAACCGGGTGTTCAGACT**TGGTTC**AATTA**TTGCT**TGGAACCTGC
Ppu F1
GCCGTGCTGCGCGGGCTTTCTCAACTGCCCGTATTCATGGGCTTTTTCTGCTTTTGGCAAGT**TGGTTC**GGAAC**TTGCT**TTAGCCCTGC
Psy DC3000
GAAGGTGATCGTCGCGTGCCTGTTTCTGCTGGTAAATCAGGCATTTGTATCGAGGCTGACAAGT**TGGTTC**AAAA**TTGCT**TTAACCTTT
Psy B728a
TCAGGCCGTCGGCAATGCCGGTTTTACTGGCTAATCAGGCATTTGTATCGAGCCTGACAAGT**TGGTTC**AAAA**TTGCT**TTAACCTTT
Psy 1448a
GAAGGGCATCATCGAATGCCGGTTTTGCTGGTAAATCAGGCATTTGTATCGAGCCCGACAAGT**TGGTTC**AAAA**TTGCT**TTAACCTTT
Pfl SBW25
CTGAAATCTTCATACCTCGCCGCAAACCCCGCCCGCTGCCTTCATGCTCTTTTAAAAAGT**TGGTTC**GCAA**TTGCT**TAAGCCTCAT
Ppr Pf-5
GTTTTTCTCTGTAATCAGGCAAAGCCTTGCCCGCTCTGGGGATCACCCTGCGTGAAAAAGT**TGGTTC**GCTTA**TTGCT**TATGGCTTCG
Consenso σ^{54} **TGGCAC** **-N₅-** **TTGCT**

PflgB

Ppu KT2440
TTTTCTGGCATCAATCTGACAGTACCGCGCCGCAAAACCCCATAAATACGGGCTTCCAGTGGT**TGGCAC**AGCC**TTGCT**ATGCCTTGCT
Ppu F1
TTTTCTGGCATCAACCTGACAGTACTGCGCCGCAATCCCCCTAAACACGGGCTTTTCCAGTGGT**TGGCAC**AGCC**TTGCT**ATACTTGCT
Psy DC3000
CGCTTTCTGGCATTGCCGCTCTGCGCTGTCTGTAACCTCGCAATCATTTGGCTTTTGAACA**TGGCAC**GCCGA**TTGCT**TTGTCTAGTAA
Psy B728a
CGCTTTCTGGCATTGCCGCTCTGCGCCGCTGTGGACCTGCAAAACATTGGCTTTTACAACA**TGGCAC**GCCGA**TTGCT**TTGTCTAGTAA
Psy 1448a
CGCTTTCTGGCATTGCCGCTCTGCGCTGTGGTGGCCCCCGCAATCATTTGGCTTTTGAACA**TGGCAC**GCTGA**TTGCT**TTGTCTAGTAA
Pfl SBW25
GCTTTCTGGCATTGCCGCTCTGCGCCGCAACCGCTCGCAAGCCCTTGATATACGGGCTCCACCAGAT**TGGCAT**GCACC**TTGCT**ATAACCTGT
Ppr Pf-5
CTTGCCGCTTCCGGTTACCCTTAAATAAACTCAAGTTATTGAATATAAAGGTTTTTAATAATT**TGGCAC**GGGCC**TTGCT**GAAGTGTGG
Consenso σ^{54} **TGGCAC** **-N₅-** **TTGCT**

PcheV

Ppu KT2440
TCATAGCGCCGGCAGTCTGGGTGGTGGACAGATAATCTTCAACGGTGAAT**TCAAGAA**ACCC**TTGGGTGAC**ACC**GATAAGCT**GTT**CAGGC**
Ppu F1
TCATAGCGCCGGCAGTCTGGGTGGTGGACAGATAATCTTCAACGGTGAAT**TCAAGAA**ACCC**TTGGGTGAC**ACC**GATAAGCT**GTT**CAGGC**
Psy DC3000
TCGTGACGCCGTCAATCTGGTTGGTTGCCAAATAGTCTTCTACTGTGAAC**TCAAGAA**ACCC**TTGGGTGAC**ACC**GATAAGCT**GTT**CAGGC**
Psy B728a
TCATGACGCCGTCAATCTGGTTGGTTGCCAAATAGTCTTCTACTGTGAAC**TCAAGAA**ACCC**TTGGGTGAC**ACC**GATAAGCT**GTT**CAGGC**
Psy 1448a
TCATGACGCCGTCAATCTGGTTGGTTGCCAAATAGTCTTCTACTGTGAAC**TCAAGAA**ACCC**TTGGGTGAC**ACC**GATAAGCT**GTT**CAGGC**
Pfl SBW25
TCATAACGGCCCGGCTCTGAGTGGTTGCCAGATAATCTTCTACAGTGAAC**TCAAGAA**ACCC**TTGAGTGAC**ACC**GATAAGT**AGAT**CAGGC**
Ppr Pf-5
TCATAGCACCTTCCGTTGACTGGTGGCCAGGTAGTCTTCTACCGTGAAT**TCAAGAA**ACCC**TTGAGTGAC**ACC**GATAAGT**AGAT**CAGGC**
Consenso FliA **TcAAgNw** **-N₁₂₋₁₃-** **gcCGAtaNc**

PflgA

Ppu KT2440
CATAACACCCGCCATGCCAGACTCCTTAACGTTTCAGCCTTTCGTTGCAACTCAGGTAGCGAGT**CGGCAC**GGGCT**TTGCT**TTTTTGAGTG
 Ppu F1
CATAACACCCGCCATGCCAGACTCCTTAACGTTTCAGCCTTTCGTTGCAACTCAGGTAGCGAGT**CGGCAC**GGGCT**TTGCT**TTTTTGAGTG
 Psy DC3000
ATTACACCTGCCATGCCGAACCCCTTACCAAAATGACCGCCACCCAGGCACCAGACCAACAAG**CGGCAC**GGGCT**TTGCT**ATTTGTTACG
 Psy B728a
CATTACACCTGCCATGCCGAACCCCTTACCAAAATGACCGCCGCCAGACACCAGATCAACAAG**CGGCAC**GGGCT**TTGCT**ATTTATTACT
 Psy 1448a
ATTACACCTGCCATGCCGAACCCCTTACCAAAATGACCGCCGCCAGACACCAGATCAACAAG**CGGCAC**GGGCT**TTGCT**ATTTATTACC
 Pfl SBW25
CTCTGCCATGCCTTGACTCCTACGCTAAAACCTTTGGGGTGCATGCGCACCCAACACTAAA**CGGCAC**GAGCT**TTGCT**ATTTATTGGT
 Ppr Pf-5
CCATTACACCGCCATGCCAGACTCCCCAAAGCTTTAAGATCCGACGCAGCTCATTGCTAAA**CGGCAC**GGCG**TTGCT**TTTTAACTGT
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGct**

PflgM

Ppu KT2440
 TGTGAGAACACGGGTTTCGCGGGCTTGCCGACAGGCGGCAATGCATTTGTGCC**TAAAGTT**TATATCGGGTT**GCCGAAAAC**AAGGCAAGCG
 Ppu F1
 TGTGAGAACACGGGTTTCGCGGGCTTGCCGACAGGCGGCAATGCATTTGTGCC**TAAAGTT**TATATCGGGTT**GCCGAAAAC**AAGGCAAGCG
 Psy DC3000
 GGAATGCCCGACGGTGAAAAGCATCTATTGAGAAGCTTTATCACAATCGGCC**TAAAGTT**TAATTGGGGTT**GCCGAAAAC**AAGGCAAGCG
 Psy B728a
 GGAATGCCCGACGGTCAAAATGTCGCTATTGGGAAGCTTTCTCACAATCGGCC**TAAAGTT**TGATGGGGTT**GCCGAAAAC**AAGGCAAGCG
 Psy 1448a
 GGAATATCCGACGGTGAAAAGCGTCTATTGGGAAGCTTTCTCACAATCGGCC**TAAAGTT**TGATAGGGTT**GCCGAAAAC**AAGGCAAGCG
 Pfl SBW25
 TTCTACACTGTGCACGAGATATCCCGTGCAGATTTATTGTGCTTTCGCGCC**TAAAGTT**CGTCCGGTATT**GCCGAAAAC**ATGGCAAGCG
 Ppr Pf-5
 GTGGCCGATAAAGGGTTCGAGATACCTGACCTGGTTTGTGACAAATCGAGCC**TAAAGTT**TTTCAGGGTAT**GCCGAAAAC**ATGGCAAGCG
Consenso Flia **TcAAgNw -N₁₂₋₁₃- gcCGAtaNc**

PflgZ

Ppu KT2440
CGCCGCTGGCCAAGCCGCGCGCTCAGCCAAGTGTGATTTTTCTATCAAGGCACAGAACATAG**TGGCAA**AATGC**CGTTA**CTTGCGTGTG
 Ppu F1
CGCCGCTGGCCAAGCCGCGCGCTCAGCCAAGTGTGATTTTTCTATCAAGGCACAGAACATAG**TGGCAA**AATGC**CGTTA**CTTGCGTGTG
 Psy DC3000
GCTTAGAGCAAAGCCACGCCCTTGAGTCAGCGCTAACTTCTGTATCAAGGTTTCGTCGCTAG**TGGCAG**AATGC**CTGTT**GTTGCGTTGC
 Psy B728a
GCTTAGAGCAAACCACGCCCTTGAGTCAGCGCTAACTTCTGTATCAAGGTTTCGTCGCTAG**TGGCAG**AATGC**CTGCT**GTTGCGTTGC
 Psy 1448a
GCTTAGAGCAAACCACGCCCTTGAGTCAGCGCTAACTTCTGTATCAAGGTTTCGTCGCTAG**TGGCAG**AATGC**CTGTT**GTTGCGTTGC
 Pfl SBW25
CCAAGCACTCGCAGCCAAGCCTGACGCCGTTTACAGCGCGCTATCCAAGACGCGCCACATAG**TGGCAG**AATGC**CTGCT**CTTGCGTGTA
 Ppr Pf-5
CACGCCACTCAGTCAGGCTTAAACCCAAAAATGAGCGCGCTACCAAGCCGTGAAACATGC**TGGCAA**AATGC**TGGCT**CCTGCGTGTA
Consenso σ^{54} **TGGCAC -N₅- TTGct**

PmotA

Ppu KT2440
TTTCAATTGGCATTTTGACATCAGTCCGAAGTGGCTTTTCGCATTGAGTGGC**TATAGTC**TGGCGCAGTTCT**GCCGATAAG**TAGAAGAAGA
 Ppu F1
TTTCAATTGGCATTTTGACATCAGTCCGAAGTGGCTTTTCGCATTGAGTGGC**TATAGTC**TGGCGCAGTTCT**GCCGATAAG**TAGAAGAAGA
 Psy DC3000
 CCAGTTTCCCTTTTATCGGACCGGAAAATGGTTTTTCAAGAACCAGGC**TATAGTC**TGGCCCAGTTAG**GCCGATAAG**GAGAAGAAGA
 Psy B728a
 CATTTCCTCCTTTTATGGAGGCGATAAATGGTTTTTCAAGAACCAGGC**TATAGTC**TGGCCCAGTTAG**GCCGATAAG**GAGAAGAAGA
 Psy 1448a
 CATTTCCTCCTTTTATGGAGGCGATAAATGGTTTTTCAAGAACCAGGC**TATAGTC**TGGCCCAGTTAG**GCCGATAAG**GAGAAGAAGA
 Pfl SBW25
 TTGCGGTCAACACACCCGAGCGGGCCGAAGTGGCTTTTCGCCTTAACGGGC**TATAGTC**TGGCGCAGTTTT**GCCGATAAG**AGGAACAAGA
 Ppr Pf-5
 CTGCTGTGAACACGCCAGAGCGGGCCAAACTGGCTTTTCGCCTTAAGTGGC**TATAGTC**TGGCGCAGTTTT**GCCGATAAG**TAGAAGAAGA
Consenso Flia **TcAAgNw -N₁₂₋₁₃- gcCGAtaNc**