



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP**



**TITULO DE LA TESIS:**  
**Análisis del dominio CHASE de la proteína híbrida  
codificada por el gen *cdgD* de *Azospirillum baldaniorum*  
Sp245.**

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y FISIOLOGÍA  
MICROBIANA

**PRESENTA:**

I.Q. DAVID RICARDO CORTÉS SOTRES.

**ASESORA DE TESIS**

**Co-ASESOR**

D. en C. LUCÍA SOTO URZÚA.    D. en C. ALBERTO RAMIREZ MATA.

**PUEBLA, PUE.**

**NOVIEMBRE 2021.**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 16 de noviembre 2021

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **David Ricardo Cortés Sotres**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Análisis del dominio CHASE de la proteína híbrida codificada por el *gen cdgD* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245"**

A nuestro juicio, el alumno **David Ricardo Cortés Sotres** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

D.C. Vianey Marín Cevada

D.C. Beatriz Eugenia Baca

D.C. Luis Javier Martínez Morales

D.C. Candelario Vázquez Cruz



## Contenido

Agradecimientos .....	6
Abreviaturas .....	7
Resumen .....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Rizosfera.....	9
1.2 <i>Azospirillum</i> .....	11
1.3 <i>Azospirillum brasilense</i> . .....	11
1.4 <i>Azospirillum</i> como PGPR.....	11
1.4.1 Colonización y Asociación de <i>Azospirillum</i> con la planta. ....	12
2. Fisiología de <i>Azospirillum</i> .....	13
2.1 Movilidad y Quimiotaxis.....	13
3. Biopelículas .....	14
3.1 El segundo mensajero di-GMPc.....	15
3.2 Síntesis y degradación de di-GMPc .....	16
3.2.1 Diguanilato ciclasas (DGC).....	16
3.2.2 Fosfodiesterasas (PDE).....	17
3.2.3 Diguanilatociclasas-fosfodiesterasas (Híbridas). ....	18
4. Dominios de señalización .....	19
4.1 Dominio PAS.....	19
4.2 Dominio CHASE.....	19
5. Citocininas (CKs).....	21
5.1 Efectos y funciones de las citocininas en plantas. ....	22
5.2 Efectos y funciones de las citocininas en bacterias. ....	23
6. Antecedentes directos .....	23
6.1 Estudios fenotípicos llevados a cabo con la cepa mutante <i>cdgD::Km<sup>R</sup></i> (12-A)...	23
6.2 Efecto de la mutación 12-A en formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos.....	24
6.3 Expresión del promotor <i>cdgD</i> durante la interacción con <i>Triticum aestivum</i> .....	25
6.4 Predicción de la estructura proteica de la proteína híbrida CdgD.....	25
7. Justificación.....	26
8. Objetivo General. ....	27
8.1Objetivos particulares .....	27
9. Esquema de trabajo.....	27

9.1 Materiales y métodos.....	28
9.1.1 Herramientas bioinformáticas.....	28
10. Resultados. ....	32
10.1 Resultados de los estudios <i>in silico</i> . ....	32
10.1.1 Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>A. baldaniorum</i> de genes que codifican proteínas que contienen dominios CHASE.....	32
10.1.2 Alineamientos.....	32
10.1.2.1 Alineamiento de las regiones N-terminales de <i>A. thaliana</i> , <i>X. campestris</i> y <i>A. baldaniorum</i> sp 245. ....	32
10.2 Predicción de la estructura proteica del dominio CHASE de la proteína CdgD. ....	34
10.3 Estudio de empalme de estructuras del dominio CHASE mediante el software PyMol.....	35
10.4 Estudios de acoplamiento molecular “Docking”. ....	35
10.4.1 Estudio de acoplamiento molecular de la Prolina como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor. ....	36
10.4.2 Estudio de acoplamiento molecular de la trans-zeatina como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor. ....	37
10.4.3 Estudio de acoplamiento molecular de la iP como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor. ....	37
10.4.4 Determinación de las mutantes a efectuar. ....	38
10.4.5 Análisis de las mutantes <i>in silico</i> en la interacción con los ligandos en estudio.....	40
10.4.6 Acoplamiento molecular con trans-zeatina como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación <i>in silico</i> R <sup>130</sup> A como receptor. ....	41
10.4.7 Acoplamiento molecular con iP como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación L <sup>142</sup> A como receptor. ....	41
10.4.8 Acoplamiento molecular con iP como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación Y <sup>111</sup> A como receptor. ....	42
11. Discusión.....	42
12. Conclusiones.....	50
13. Perspectivas.....	50
14. Bibliografía.....	51
15. Anexos.....	55
Anexo 1 .....	55
Validación del modelo obtenido con Swis-Model con 6k62 como molde, mediante la plataforma Mol-Probity.....	55
Anexo 2 .....	56

<b>Estudio de empalme de estructuras con el software Chimera.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 3. ....</b>	<b>57</b>
<b>Validación de los estudios de acoplamiento molecular. ....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo 4 ....</b>	<b>58</b>
<b>Análisis de las interacciones no covalentes entre la iP y la cavidad del dominio CHASE de la proteína CdgD.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 5 ....</b>	<b>59</b>
<b>Análisis de la distribución de cargas del dominio CHASE de la proteína CdgD. ....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo 6 ....</b>	<b>60</b>
<b>Condiciones de cultivo y cepas bacterianas.....</b>	<b>60</b>
<b>Técnicas de biología molecular.....</b>	<b>61</b>
<b>Extracción de DNA genómico.....</b>	<b>61</b>
<b>Extracción de DNA plasmídico ....</b>	<b>62</b>
<b>Amplificación del gen <i>cdgD</i> por PCR. ....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo 7 ....</b>	<b>65</b>
<b>Mapa genético del gen <i>cdgD</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 que indica la localización de los iniciadores y las regiones que amplifican. ....</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 8 ....</b>	<b>65</b>
<b>Resultados experimentales.....</b>	<b>65</b>
<b>Determinación de la dirección del gen <i>cdgD</i> en las clonas 8 y 12.....</b>	<b>65</b>

## **Agradecimientos.**

A mi madre.

A Selvy B. Somasoundirapille (Selvita).

A Flora Sotres B.

A la doctora en ciencias Beatriz Eugenia Baca.

Al doctor en ciencias Alberto Ramírez Mata.

A la doctora en ciencias Sandra Reyes Carmona.

A la maestra Mary Xiqui.

A todas mis compañeras y compañeros del Laboratorio de interacción bacteria planta.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la BUAP

## Abreviaturas

PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas
NO	Óxido Nítrico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
HGT	Transferencia horizontal de genes
EPS	Exopolisacáridos
LPS	Lipopolisacáridos
di-GMPc	Ácido di-(3'-5') guanosín monofosfato
DGC	Diguanilato ciclasa
PDE	Fosfodiesterasa
GTP	Guanosín trifosfato
CdgD	Diguanilato ciclasa D
LB	Luria Bertani
LB*	Luria-Bertani Modificado
Nfb	Fijación biológica de nitrógeno
RC	Rojo Congo
Km	Kanamicina
Tc	Tetraciclina
Ap	Ampicilina
DO	Densidad óptica
CV	Cristal Violeta
CKs	Citocininas
LBD	Dominio de unión a ligando
iP	isopentiladenina
tZ	trans-zeatina

## Resumen

*Azospirillum brasilense* es una PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), debido al efecto benéfico demostrado que ejerce en diferentes plantas de interés agronómico. Para una efectiva y prolongada interacción bacteria-planta, este microorganismo forma biopelículas, las cuales son comunidades bacterianas inmersas en sustancias poliméricas extracelulares. El segundo mensajero Diguanosin Monofosfato cíclico (di-GMPc) se definió como un mecanismo de regulación de varios fenotipos, entre ellos la transición de la célula planctónica a sésil (formación de biopelícula). La concentración intracelular del di-GMPc es regulada mediante dos actividades enzimáticas opuestas, la síntesis y degradación del segundo mensajero. Las que presentan actividad de DGC, se caracterizan por presentar los motivos GGD(E)EF, conservados, mientras que las fosfodiesterasas (PDEs) contienen motivos conservados EAL, ambas incluyen en su arquitectura modular, diversos dominios de señalización, tales como REC, PAS, MHYT, GAF, CHASE y CACHE. En nuestro grupo se llevó a cabo el estudio fenotípico del gen *cdgD* que codifica para una proteína híbrida, que cuenta con ambos dominios DGC y PDE con motivos conservados GGDEF y EAL, anotándose como CdgD, proteína multidominio que posee también los dominios de señalización PAS y CHASE. El análisis fenotípico mostró que el gen *cdgD* codifica para una proteína modular reguladora del di-GMPc implicada en producción de biopelícula, sustancias poliméricas extracelulares y movilidad, que se expresa en vida libre y en asociación con la planta. Por lo que, consideramos relevante continuar con el estudio de CdgD, para analizar el papel del dominio sensor CHASE, mismo que posiblemente estaría regulando su función como DGC y/o PDE como respuesta a la unión al ligando(s). Para establecer la interacción del dominio CHASE de CdgD con distintos posibles ligandos, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando los siguientes ligandos: prolina, trans-zeatina (tZ), e isopentiladenina (iP), y a la región periplásmica de CdgD como receptor, obteniéndose datos relevantes ya que la prolina, si bien se unió al sitio de unión conocido (cavidad de la región denominada PAS distal), esta unión se dio con una menor afinidad ligando receptor ( $\Delta G$ ), en tanto que, entre las hormonas vegetales tZ e iP, de acuerdo a los valores termodinámicos de los análisis *in silico*, sería la iP la que presentaría una mayor afinidad y la señal química que modificara su función. Para reforzar este resultado se diseñaron *in silico* tres mutaciones de

residuos de aminoácidos conservados:  $R^{130}A$ , con una  $\Delta G$  menor respecto al CHASE nativo, propiciando una mejor unión del ligando (iP) al receptor. La mutación  $L^{142}A$ , mostró disminución de manera significativa en la probable unión del ligando a la cavidad (región PAS distal), observado en un aumento en la  $\Delta G$ , en tanto que el cambio de  $Y^{111}A$  abatió de manera significativa la unión del ligando receptor, con  $\Delta G$  positivo.

Con el fin respaldar de manera experimental estas predicciones, se diseñaron iniciadores que permitan obtener las mutantes que modifiquen el dominio CHASE, en el plásmido generado en este estudio inicial.

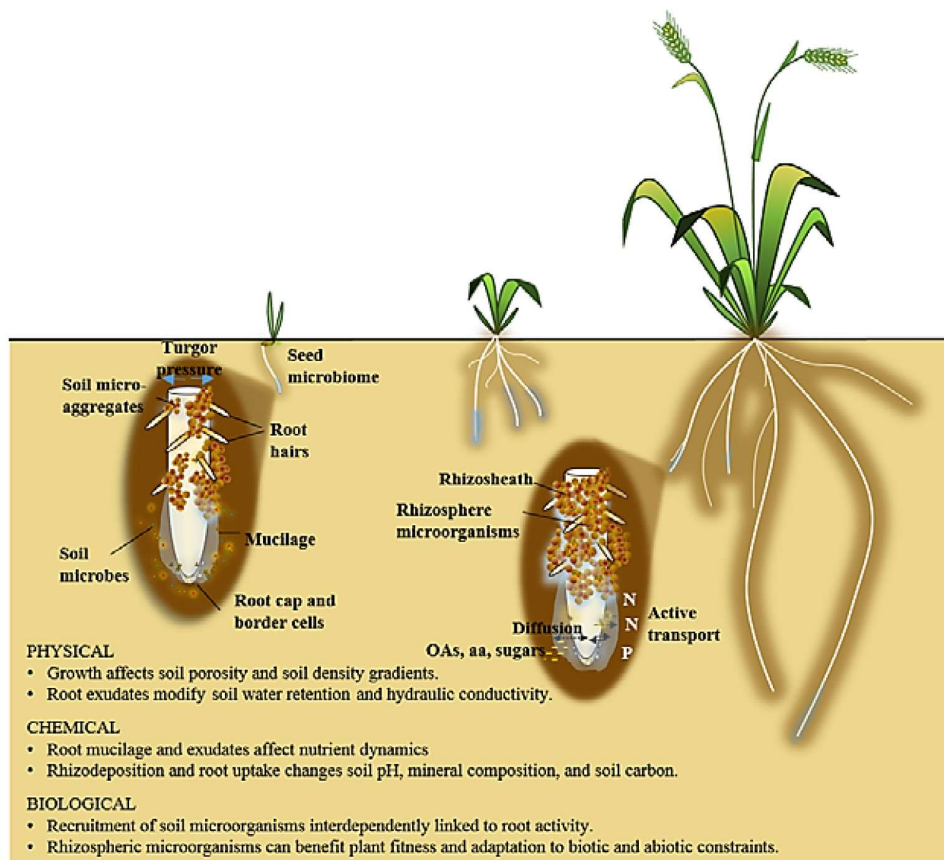
## **1. Introducción.**

El déficit alimentario que prevalece en el mundo y especialmente en las regiones con un menor desarrollo económico, obedece a diversos factores y es complejo. Por tal motivo es fundamental el aporte de conocimientos que den lugar a prácticas de cultivo sustentables y sostenibles que sustituyan a las hoy predominantes, las cuales se basan en el uso de pesticidas y nutrientes de naturaleza inorgánica. Los que, si bien ofrecen beneficios en cuanto al rendimiento de los cultivos, son altamente contaminantes y erosionan el suelo, además de generar desequilibrios ecológicos. Al paso del tiempo esto ha propiciado que hoy en día exista una menor disposición de suelos cultivables sanos, por lo que, de seguir esta tendencia, los recursos naturales necesarios para la agricultura se verán condicionados, y en algunos casos ya no estarán disponibles para generaciones futuras. Lo que hace el estudio de los ecosistemas del suelo y sus diversos componentes, un tema clave en el desarrollo de nuevas maneras de abordar el tema de la agricultura, refiriéndonos con esto a la denominada Agroecología (Pedraza et al., 2020).

### **1.1 Rizosfera**

La rizosfera es el ambiente biofísico y biogeoquímico localizado en la zona del suelo influenciada por los exudados radiculares de la planta, los cuales, tienen una composición distinta adecuándose a la diversidad de condiciones del medio y a la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta, diseñando así su propia microbiota, atrayendo o repeliendo a los microorganismos de la rizosfera según lo requiera, se ha reportado que entre los principales componentes de los exudados radiculares se encuentran: ácidos orgánicos, intermediarios del ciclo de los ácidos-tricarboxílicos, carbohidratos, fitohormonas, compuestos fenólicos, vitaminas, aminoácidos, etc. En la rizosfera se llevan a cabo una serie de interacciones entre los distintos organismos que la habitan, es decir entre la planta y

bacterias, hongos, virus, nemátodos y los unos con los otros indistintamente (interacción planta-microorganismo, microorganismo-microorganismo, etc). Todas estas formas de vida deben satisfacer necesidades nutricionales que consisten principalmente en fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y los llamados oligoelementos, su desarrollo y supervivencia se ven también condicionados por factores ambientales como pH, temperatura, O<sub>2</sub>, humedad, etc. Estas necesidades y condiciones son cubiertas en la rizosfera ya que se suscitan tanto sinergias y cooperaciones como antagonismos que dan origen a eventos de coevolución que aseguran la supervivencia de sus habitantes, este nicho ecológico, cuyas características y condiciones son dinámicas y están condicionadas por la expresión de diversos sistemas de defensa, simbiosis, cooperación y adaptación es muy complejo. La rizosfera es influenciada por los genomas de sus habitantes y la expresión de determinados genes de acuerdo con las condiciones puntuales prevalecientes, son entonces estas características las que hacen tan relevante su estudio, **Figura 1** (de la Fuente Cantó et al., 2020).



### **Figura 1.**

**Establecimiento de la rizosfera y aumento de la complejidad en todo el ciclo de vida de la planta.** Procesos y rasgos físicos, químicos y biológicos clave que confirman el fenotipo extendido. Tomado de: de la Fuente Cantó et al., 2020.

#### **1.2 *Azospirillum***

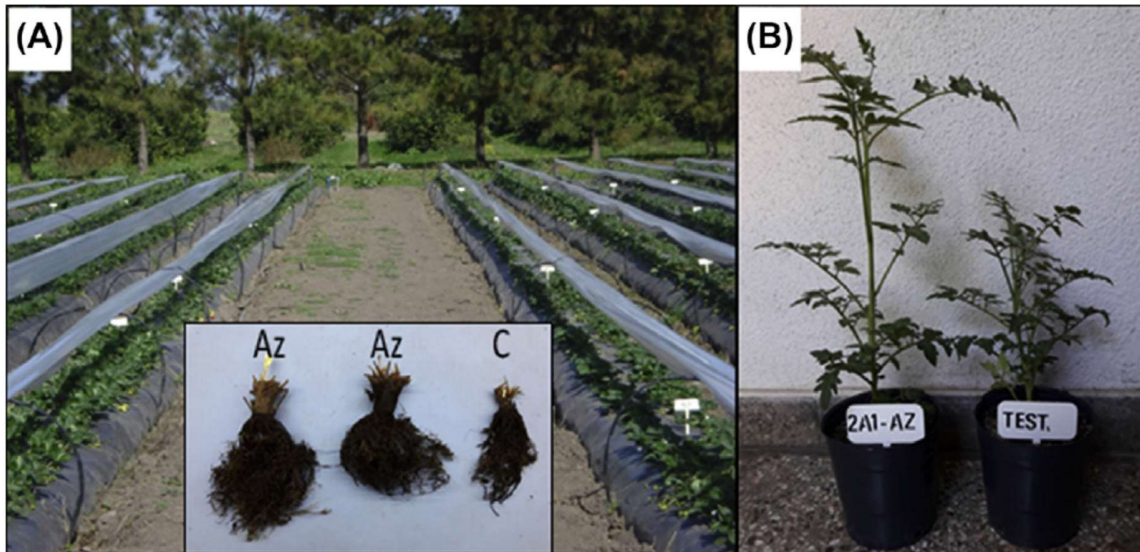
Se reportó por primera vez un aislado del género *Azospirillum* de suelos pobres en nitrógeno en los Países Bajos en 1925, inicialmente anotado como *Spirillum lipoferum* (Beijerinck, citado en Cassán et al., 2020), es una  $\alpha$ -proteobacteria, Gram negativa, perteneciente a la familia *Rhodospirillaceae*. De forma vibroide, de 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0-3.0  $\mu\text{m}$  de largo. Las células pueden cambiar de forma y tamaño de acuerdo con la edad de cultivo produciendo quistes (Okon, 1985; Burdman et al., 2000). Crece de manera óptima a 30-32 °C y a un pH entre 6.0 y 7.0 (Bashan et al., 2004), en medio de cultivo sólido con la adición del colorante Rojo Congo, se describen colonias de color rojo escarlata, debido a las sustancias que componen la biopelícula (Rodríguez-Cáceres, 1982).

#### **1.3 *Azospirillum brasilense*.**

*A. brasilense* se describió en Brasil por primera vez en 1978, en el grupo de trabajo de Johana Döbereiner (Bergey et al., 1984). Las dos cepas más estudiadas son Sp7 (ATCC 29145) y Sp245 (Anotada actualmente como *A. baldaniorum*Sp245)(dos Santos Ferreira et al., 2020), ambas fueron aisladas de pastos tropicales en Seropedica, Brasil.

#### **1.4 *Azospirillum* como PGPR.**

Debido a que este género se encuentra muy difundido en la rizosfera de muy diversos cultivos en todo el mundo, aportando beneficios diversos que se traducen en la promoción del crecimiento en las plantas con las que se asocia, se le ha clasificado dentro de un grupo denominado PGPR, por múltiples mecanismos: fijación nitrógeno en vida libre en ambientes con niveles bajos de oxígeno, producción fitohormonas como AIA, IBA, citocininas, giberelinas, NO (de-Bashan et al., 2010), solubilización sales de fosfato, producción de sideróforos, competencia con fitopatógenos, y confiere protección contra factores abióticos causantes de estrés como sequía, salinidad, o compuestos tóxicos (Fukami et al., 2018), estimulando el crecimiento de la raíz y la formación de pelos radiculares, lo cual aumenta la capacidad de la planta para obtener agua y nutrientes del suelo (Cassán et al., 2020).



**Figura 2.**

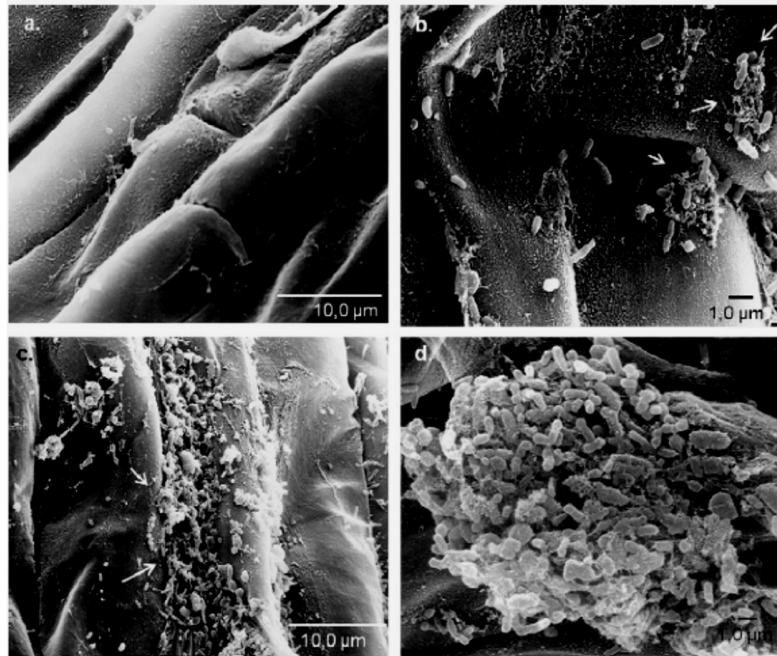
**Plantas inoculadas con *A. brasilense*.**

(A) Cultivo de raíces de fresa inoculadas con *A. brasilense* (Az) y el control (c) sin inoculación bacteriana. (B) Planta de tomate inoculada con *Azospirillum* (izquierda) y el testigo (derecha). Tomado de: Pedraza et al., 2020

**1.4.1 Colonización y Asociación de *Azospirillum* con la planta.**

La adherencia de las células de *Azospirillum* a la superficie de la raíz de la planta se considera el primer paso en el proceso de colonización (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000), puesto que *Azospirillum* coloniza fundamentalmente la superficie de la raíz de la planta, no obstante a que se ha reportado que algunas cepas son capaces de colonizar los tejidos internos de la planta sin por ello causar señales visibles de daño o infección al hospedero (Schulz & Boyle, 2006; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). *A. brasilense* se ubica al interior de la planta a través de cortes naturales del tejido cortical de la planta, justo en donde se encuentran las uniones con las raíces laterales o por pelos radiculares lisados. La facultad de *A. brasilense* para alcanzar poblaciones significativas en la superficie radicular es una condición “*sine qua non*” para aportar sus efectos benéficos, misma que está en función de diversos factores, entre los que se mencionan todos aquellos involucrados en la colonización de las plantas (movilidad, quimiotaxis, y formación de biopelícula); hidrofobicidad y carga de la pared celular, presencia de lipopolisacáridos y lectinas, etc., necesarios para una exitosa interacción bacteria-planta, sin embargo algunos estudios mencionan, que la quimiotaxis sería uno de los procesos de más preponderancia, ya que influye en la llegada de los microorganismos a

la rizosfera, contribuyendo esto a su supervivencia y mejorando su capacidad de colonización para propiciar un contacto cercano entre los dos organismos, **Figura 3**.



**Figura 3.**

**Microfotografía electrónica por escaneo de plántulas de fresa colonizadas por *A. brasilense*.**

(a) Raíz control sin bacteria; (b) células bacterianas de *A. brasilense* colonizando el rizoplano de la raíz de la fresa; (c) agregados bacterianos; (d) formación de biopelícula. Las flechas muestran material semejante a gránulos. Tomado de: Guerrero-Molina *et al.* 2012

## 2. Fisiología de *Azospirillum*

### 2.1 Movilidad y Quimiotaxis.

*A. brasilense* es una bacteria muy móvil por la presencia de un flagelo polar, cuya expresión es constitutiva, responsable del movimiento natatorio, así como de flagelos peritricos que se expresan en medios viscosos habilitando el movimiento en superficies, bióticas y abióticas; ambos movimientos son regidos por quimiotaxis (Lara, 2018). Se ha descrito que en *Azospirillum*, además de la motilidad, el flagelo polar participa en la adherencia a la superficie de las raíces de las plantas gracias a una adhesina presente en la parte más distal de la flagelina polar, Figura 4, (Rodrigues *et al.*, 2015).

La quimiotaxis es un movimiento dirigido y propiciado por un gradiente de concentración. Este fenómeno le permite a la célula bacteriana ubicarse en regiones en donde las condiciones son más adecuadas para su supervivencia y desarrollo. El fenómeno de quimiotaxis se basa en la respuesta (movimiento) desencadenada gracias a un estímulo externo (quimioattractante

o quimiorrepelente), en el caso específico de las bacterias que habitan en la rizosfera estas señales químicas se encuentran en los exudados radiculares. Que responden gracias a un intrincado sistema de intercomunicación mediado por moléculas químicas que, al ser emitidas por la planta, deberán ser percibidas por la bacteria, para lo cual evolutivamente se han seleccionado dominios proteicos con esta función, y es muy interesante el hecho de que plantas, bacterias y otros organismos que conviven simpátricamente comparten estos sistemas (hormona-receptor), entendiéndose esto como una co-evolución (Savelieva et al., 2018; Zhulin et al., 2003).



**Figura 4.**

**Estructuras flagelares de Azospirillum.**

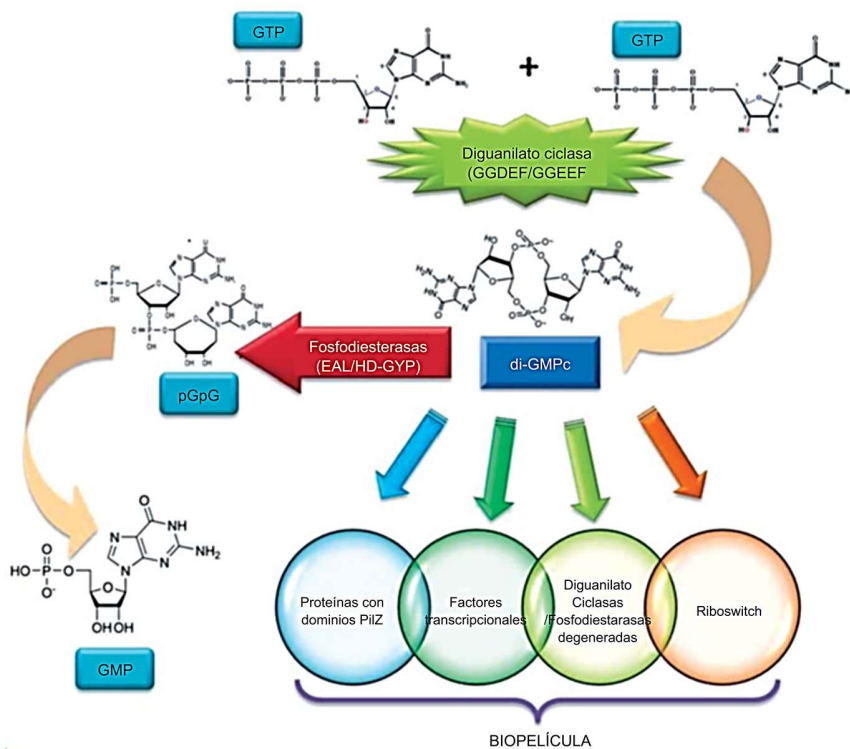
Panel A) se aprecian los flagelos peritricos, Panel B) el flagelo polar único Tomado de: Gupta, Gopal, & Tilak, 2000.

### **3. Biopelículas**

La capacidad de las bacterias para transitar de un estado de vida móvil a uno sésil, es vital para su supervivencia y crecimiento, entonces la formación de biopelícula es una etapa crucial durante su ciclo de vida en la que los microorganismos forman un consorcio bacteriano embebido en una matriz extracelular formada de exopolisacáridos, ADN extracelular (ADNe), proteínas, lípidos, adhesinas, y un 97% de agua; esta presenta canales que tienen la función de habilitar el flujo de agua, nutrientes y oxígeno hasta los puntos más profundos de la misma (McDougald et al., 2012), la formación de esta estructura constituye un ciclo de iniciación, maduración, mantenimiento y dispersión, y las bacterias parecen iniciar el desarrollo de biopelículas en respuesta a señales ambientales específicas, como la disponibilidad de nutrientes, (O'Toole et al., 2000), **Figura 3.**

### 3.1 El segundo mensajero di-GMPc

En la década de los ochenta, se describió el sistema novedoso de señalización celular en bacterias dirigido por el nucleótido cíclico di-GMPc, descubierto como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa en *Gluconobacter xylinus* (Römling *et al* 2013). Posteriormente, se ha descrito como un mecanismo de regulación de varios fenotipos, y en especial la transición de la célula planctónica a sésil (formación de biopelícula). La concentración celular del di-GMPc es regulada por dos actividades enzimáticas antagónicas de síntesis y degradación por proteínas que se caracterizan por incluir en su estructura dominios nombrados GGDEF por los residuos de aminoácidos conservados de las proteínas con actividad de diguanilato ciclasa (DGC), mientras que las fosfodiesterasas (PDEs) contienen los dominios EAL o HD-GYP (Galperin 2005). Es importante señalar que la regulación de los niveles intracelulares del segundo mensajero mediante los cuales se controlan las funciones celulares obedece a redes complejas que operan gracias a la función y actividad de las diversas proteínas reguladoras del di-GMPc, nombradas proteínas modulares de señalización debido a que en su estructura a menudo están presentes dominios especializados en la detección de diversos estímulos del medio. (Ramírez-Mata *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019 ; Dayton *et al.*, 2020. Lo que explica la redundancia de genes que codifican para estas proteínas en los genomas bacterianos, pues si bien algunas bacterias carecen de estos, se han identificado más de 4200 dominios GGDEF, 2500 dominios EAL y 200 dominios HD-GYP en diferentes genomas secuenciados de bacterias. (Galperin, 2004). La existencia de proteínas multidominio que cuentan con diversos dominios sensores sugiere la capacidad potencial para detectar un amplio rango de señales y por consecuencia contar con estrategias de respuesta y adaptación con una flexibilidad significativa a señales del entorno (Römling *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017), **Figura 5**.



**Figura 5.**

**Esquema de vías de señalización en las que interviene el di-GMPc en la formación de biopelícula.**

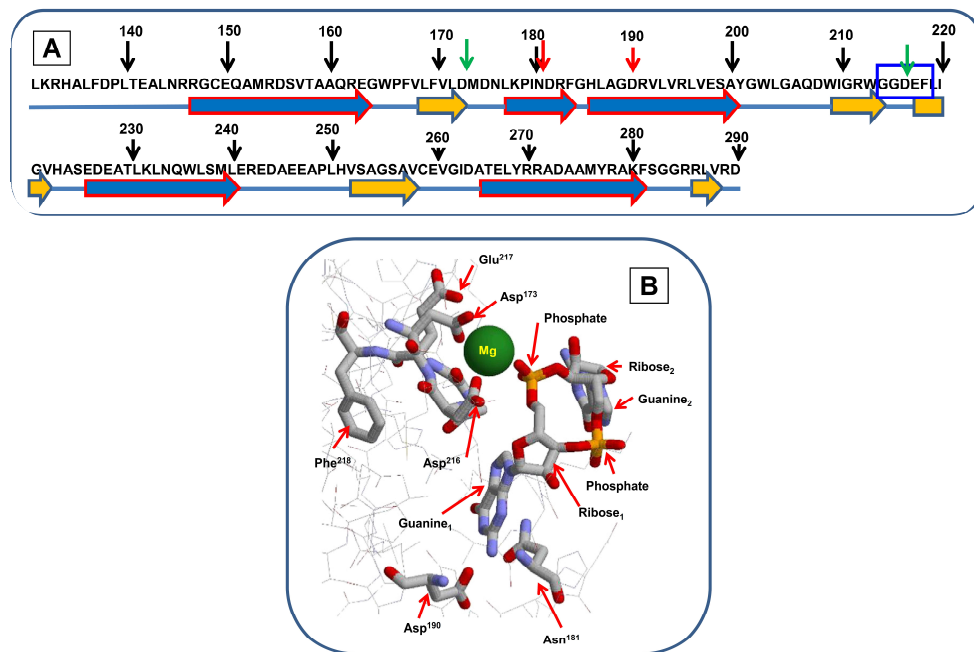
Enzimas que lo metabolizan: DGC, y PDE. Se indican los dominios característicos de cada una de ellas. Estructura del segundo mensajero di-GMPc y de los nucleótidos pGpG y GMP derivados de la actividad de PDE. Receptores (blancos) que transmiten la señal para formar la biopelícula. Tomado de: Ramírez Mata et al., 2014.

**3.2 Síntesis y degradación de di-GMPc**

**3.2.1 Diguanilato ciclasas (DGC)**

La reacción que catalizan estas enzimas es la formación de dos enlaces fosfodiéster entre el mismo número de moléculas de GTP como sustrato, uniéndose una molécula de sustrato a cada monómero formando así el homodímero catalíticamente activo. Se describió que dominios PAS participan en la formación de la forma dimerica; mientras que en otros casos esta interacción se atribuye a la presencia de un dominio REC adicional en la arquitectura modular de la proteína. Las DGC para su función catalítica requieren de los iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como cofactor y los motivos de unión al cofactor se encuentran conservados (residuos de aminoácidos DD ó DE), cinco aminoácidos río arriba del sitio catalítico se ubica el sitio alostérico o de inhibición (I-Site), constituido por los motivos conservados RXXD, por último se encuentra el sitio catalítico definido por los motivos conservados: GGDEF o GGEEF; sin embargo se han descrito otras DGCs que pueden cambiar el primer aminoácido por V y/o S. Se definió que los aminoácidos D, son los que unen al nucleótido guanina, y se

ha estudiado que aquellas en las que los motivos estén degenerados pierden su función como DGC funcionando en cambio como reguladores alostéricos de una PDE vecina ligando al di-GMPc, lo cual sugiere que dicha función se establece habiendo una alta disponibilidad de di-GMPc en la célula (altos niveles de di-GMPc) (Jenal & Malone, 2006), esto confirma la complejidad de la regulación de los niveles intracelulares del segundo mensajero Figura 6, (Römling & Simm, 2009; Jenal *et al.*, 2017; Whiteley & Lee, 2015).



**Figura 6.**

**Análisis del sitio activo de una DGC.**

A: Mapa de las estructuras primaria y secundaria de la DGC de *Xanthomonas campestris* [PDB: 3QYY]. Los residuos que se unen al nucleótido son indicados por flechas rojas. Los residuos que se unen con Mg se indican mediante flechas verdes. Los residuos en un recuadro azul representan el sitio de unión del GTP- GGDEF B: Sitio activo mostrando el motivo GGDEF y c-di-GMP con Mg asociado, formando una fuerte asociación mediante puentes de hidrogeno con el anillo de guanina. Tomada de: Whiteley & Lee, 2015

**3.2.2 Fosfodiesterasas (PDE)**

La PDE con motivos conservados EAL tiene la función de catalizar la hidrólisis de uno de los enlaces fosfodiéster que forman la molécula del di-GMPc (Jenal *et al.*, 2017; Dahlstrom & O’toole, 2017), éstas se asocian frecuentemente a un dominio REC que al ser fosforilado habilita la función de estos dominios de degradación del segundo mensajero. (Wang *et al.*, 2017; Wang & Qian, 2019). Estos dominios proteicos constan de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos y el primero en ser descrito fue en la proteína BvgR de *Bordetella pertussis*, que actúa como reguladora de algunos genes denominados *vrg49* (virulence

repressed genes, por sus siglas en inglés). Estas proteínas son capaces de convertir de forma específica y rápida el c-di-GMP a su forma lineal pGpG, empleando como cofactor los iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , y son inhibidas por los iones  $Ca^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , (Jenal & Malone, 2006)

Las otras proteínas PDEs capaces de hidrolizar el di-GMPc contienen los motivos conservados HD-GYP, proteína descrita en el patógeno vegetal *Xhantomonas campestris* como regulador de respuesta (anotada como RpfG), de una cinasa histidínica (anotada como RpFC) que, tras ser activada por fosforilación en el dominio REC, hidroliza al di-GMPc en dos moléculas de GMP (Wang & Qian, 2019).

### **3.2.3 Diguanilatociclasas-fosfodiesterasas (Híbridas).**

Proteínas denominadas así por su doble función, pues contienen ambos dominios, DGC y PDE, éstas como las DGCs y PDEs de dominio único frecuentemente se encuentran asociadas a dominios de señalización extracelulares e intracelulares ubicados en el extremo N terminal, que modulan la actividad y función de los dominios DGC o PDE según sea el caso, para responder a las señales externas e internas. Entre estos dominios de señalización se encuentran el CHASE, PAS, GAF, HAMP, MHYT, REC y CACHE. (Dahlstrom & O'toole, 2017).

Existen tres escenarios posibles en lo que respecta a la función de estas proteínas.

- 1) Ambos dominios están conservados y por lo tanto ambos son funcionales y estarán regulados por el dominio de señalización, en virtud de la unión a un ligando específico o la detección de alguna señal, estímulo del medio o condición interna, de tal manera que se habilite así la función de uno u otro dominio (PDE o DGC). (Jenal & Malone, 2006)
- 2) Solo un dominio está conservado y por lo tanto es funcional, el otro dominio que no está conservado, sin embargo, tendrá la función de modular la actividad del dominio catalíticamente activo. En efecto se han reportado proteínas PDE's que son reguladas por el dominio DGC degenerado, que unen al GTP, unión que permite activar a la PDE (Jenal & Malone, 2006)
- 3) Ambos dominios están degenerados y por lo tanto son catalíticamente inactivos, pero funcionan como receptores del di-GMPc (Jenal & Malone, 2006).

Estas proteínas desempeñan un papel preponderante en cuanto a la adaptación de la bacteria a su medio se refiere, ya que constituyen un mecanismo de respuesta ágil a los cambios que implica la vida en un entorno tan dinámico y cambiante como lo es la rizosfera (Jenal & Malone, 2006; Whiteley & Lee, 2015).

## **4. Dominios de señalización**

### **4.1 Dominio PAS**

Los dominios PAS ocurren en proteínas de organismos arqueas, procariontes y eucariontes describiéndose primero en las siguientes proteínas de eucariontes: Proteínas del reloj de la mosca PERIOD, la Arilhidrocarbon translocasa (ARNT), y el Regulador de desarrollo de la mosca Single minded (SIM), de ahí Per-Arnt-Sim o PAS (Henry & Crosson, 2011). Estos dominios no conservan en general la secuencia de residuos de aminoácidos, mientras que la estructura secundaria es altamente conservada, de manera general consiste en un dominio descrito como un repetido PAS, motivo PAS/PAC o caja S1/S2, cuya estructura es única y con aproximadamente 100 residuos de aminoácidos de longitud, componiéndose de una cadena quintuple de beta plegadas única, con un orden en las cadenas tipo 2-1-5-4-3 interviniendo  $\alpha$ -hélices para formar una cavidad sobre las beta plegadas, dentro de la cual a menudo ocurre el acoplamiento del ligando. Debido a que son dominios sensores celulares seleccionados para distintas funciones, las moléculas que unen son muy diversas, habiéndose encontrado dominios PAS que unen a grupos Hemo, flavin nucleótidos (FMN), flavin adenin dinucleótidos (FAD), ácido-4-hidroxicinámico (4-HCA), ácidos carboxílicos de 3 y 4 carbonos ( malonato, malato y succinato), ácidos carboxílicos de C6 (Citrato), así como cationes metálicos con doble valencia, y se ha estudiado también que los ácidos grasos podrían ligarse a los dominios PAS, (Henry & Crosson, 2011). Se ha mostrado también que estos dominios participan en la interacción proteica necesaria para una homodimerización, en cinasas histidínicas, en proteínas de unión a sustrato, así como en proteínas DGCs, PDEs e Híbridas (Zhang et al., 2019).

### **4.2 Dominio CHASE**

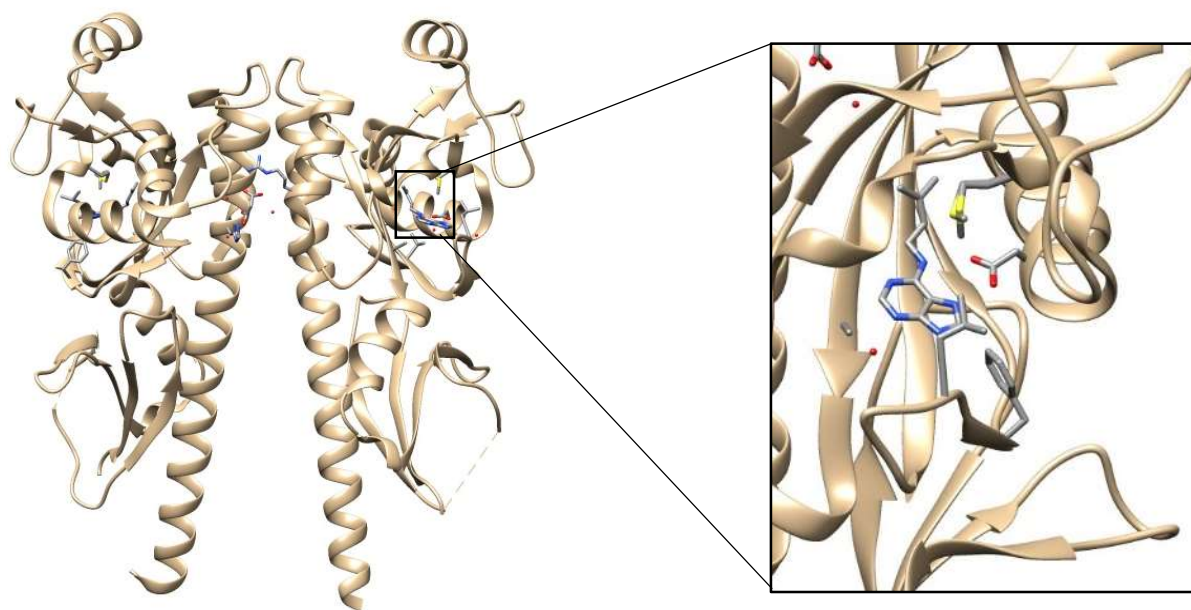
Los dominios CHASE son dominios sensores extracelulares involucrados en sistemas de transducción de señales en todos los reinos de la vida, estos se encuentran flanqueados, por dos dominios transmembranales que los ubican anclados a la membrana plasmática, estos dominios en primera instancia se reportaron asociados a cinasas histidínicas en sistemas de doble componente, y por ello su nombre Cyclases/ Histidine kinases Associated Sensory

Extracelular **CHASE** (Acrónimo del inglés). Sin embargo, también están asociados a proteínas con función de DGCs, PDEs, DGC/PDE, así como a proteínas de quimiotaxisceptoras de metilo (MCP por sus siglas en inglés), (Zhulin et al., 2003). La predicción de la estructura de los dominios CHASE se clasificó inicialmente como un dominio sensor tipo PAS, el cual estaría ubicado en la célula a nivel intracelular o extracelular; en realidad estas similitudes entre el dominio PAS y el dominio CHASE, no son una casualidad, pues existen estudios que asocian filogenéticamente a los dominios PAS, CHASE y CACHE, ( $\text{Ca}^{+2}$ , Chemotaxis receptor, acrónimo del inglés), (Pas et al., 2004). De hecho, se llegó a la convención de que cierto tipo de dominios PAS que cumplen con características tanto estructurales como de ubicación en la célula serían clasificados como PAS-like (Henry & Crosson, 2011). Existe una clasificación de dominios CHASE en la que se nombran desde CHASE hasta CHASE6, estos distintos dominios guardan diferencia estructural y se unen a diversos ligandos. Haremos especial énfasis en los de tipo CHASE, CHASE2 y CHASE3.

El dominio CHASE2 se localiza en el espacio periplásmico y ocurre en adenilato ciclasas, DGCs y cinasas histidínicas, se compone de 250 a 300 aminoácidos que forman una estructura secundaria predicha que consiste en 6  $\alpha$  hélices y 8  $\beta$  plegadas, conserva algunos residuos con carga que son elementos característicos de este dominio dos en la  $\alpha$  hélice 1, dos en los límites de la  $\beta$  plegada 2, uno en la  $\alpha$  hélice 2, dos en el “loop” entre la  $\alpha$  hélice 1 y la 2, uno en la  $\alpha$  hélice 4, y dos que anteceden a la  $\beta$  plegada 4, sin embargo no se reporta el ligando al que podría unirse (Zhulin et al., 2003). De manera similar en el dominio CHASE3 se describe la información respectiva a su secuencia y estructura secundaria, que consistiría en un dominio conformado por 130 a 150 aminoácidos cuya estructura secundaria aparentemente estaría constituida únicamente por  $\alpha$  hélices (de 4 a 6  $\alpha$  hélices putativas), la firma del dominio CHASE3 la constituyen los residuos Arg-Gly-aromático-alifático-alifático-alcohol, que se ubican en un “loop” altamente conservado que conecta las  $\alpha$  hélices 1 y 2, otros elementos distintivos son una tirosina conservada en el  $\alpha$  hélice 2 y un residuo con carga conservado en el  $\alpha$  hélice 5 (Zhulin et al., 2003). De manera muy relevante en el estudio reportan una configuración consecuente con un arreglo del tipo FHB (por sus siglas en inglés Four Helix Bundle).

Este subgrupo de dominios PAS en el que se ubica el dominio CHASE, actualmente ha tomado relevancia desde que se describió asociado a una cinasa histidínica AHK4 de

*Arabidopsis thaliana*. Dichos estudios se basaron en la obtención del cristal del dominio CHASE de AHK4 y cuyos análisis bioinformáticos evaluaron a las moléculas tZ, a la Isopentil-Adenina (iP) y algunas otras citocininas sintéticas derivadas de la Urea, analizando su interacción como ligandos específicos de CHASE. Los estudios mostraron como resultado que las moléculas iP, tZ y Thiadiazurion (TD) se alojan en la cavidad del dominio PAS distal de CHASE, Figura 7, (Hothorn et al., 2011). Posteriormente, se confirmó la predicción obtenida *in silico*, por medio de experimentos realizados *in planta* e *in vitro* para determinar la afinidad de esos distintos ligandos (citocininas) y sus receptores de membrana homólogos con las cinasas histidínicas AHK2, AHK3, and CRE1/AHK4 de *A. thaliana* (Savelieva et al., 2018). Aspecto que confirmó los previos estudios bioinformáticos al demostrar la unión de la fitohormona iP a la cavidad del PAS distal del dominio CHASE de la AHK4. (Hothorn et al., 2011).



**Figura 7.**

**Estructura proteica del cristal del dominio CHASE anotado en la base de datos PDB como 3t4j de la cinasa histidínica AHK4 de *A. thaliana* co-cristalizado con iP como ligando.**

Se observa al ligando alojado en la cavidad del PAS distal y con malonato unido a las dos alfa hélices centrales de la estructura. Tomado de: Samanovic et al., 2018.

## **5. Citocininas (CKs)**

Son hormonas derivadas de la purina adenina, en la posición  $N^6$  presenta distintas sustituciones ya sea por isoprenoides o anillos aromáticos, no obstante, la adenina no presenta

efecto hormonal, (Jordán & Casaretto, 2006). Si bien la presencia pleiotrópica de las CKs en plantas está bien documentada, es notable que estas moléculas también se encuentren en otros organismos, incluidas bacterias, hongos, nematodos, insectos, e incluso humanos. En estos organismos, las funciones, actividades y efectos de las CK difieren, y el conocimiento es actualmente escaso y fragmentario. Por ejemplo, hay cada vez más evidencias del papel de las CKs en la promoción de la virulencia en enfermedades transmitidas por hongos. En particular, esto se observa en los sistemas bióticos *Magnaporthe oryzae* (hongo del tizón del arroz) / *Oryza sativa* (arroz) así como en *Claviceps purpurea* (cornezuelo de centeno) / *Secale cereale* (centeno). Otro ejemplo interesante del papel fundamental de las CK en las interacciones bióticas es la capacidad de un nematodo parasitario en plantas de sintetizar derivados de CK para manipular sistemas del huésped y establecer interacciones parasitarias a largo plazo. Respecto al papel de las CKs en amebas, se reportó recientemente que el limo *Dictyostelium discoideum* produce seis CK diferentes (en particular cis-zeatina, isopenteniladenina y discadenina), que modulan coordinadamente las diferentes etapas de desarrollo de este protista (Aoki et al., 2020). Sin embargo, los estudios sobre la presencia y el papel de las CKs en organismos no vegetales se han centrado en gran medida en bacterias (Kabbara et al., 2020).

### **5.1 Efectos y funciones de las citocininas en plantas.**

Este grupo de hormonas vegetales es considerado el responsable de los procesos de división celular, entre los que se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, la germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular y también del control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y en la transducción de señales. (Klee & Estelle 1991, Sakakibara, 2006). Las citocininas son hormonas esenciales en la activación de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas, también se relacionan con la expresión de una variedad de genes. Estas son producidas como respuesta a la luz roja (por lo que parece estar implicado el fitocromo), y son también estimuladas por el aumento de la concentración de oxígeno en el medio o por la presencia en el suelo de nitratos y sulfatos. Por el contrario, las condiciones de estrés inhiben la acción de las CKs, lo que es coherente desde el punto de vista de las necesidades de adaptación de la planta, ya que impide que las semillas germinen cuando las

condiciones no son las adecuadas. En cuanto a los factores endógenos, tanto el etileno como las giberelinas activan la actividad de las CKs.

## **5.2 Efectos y funciones de las citocininas en bacterias.**

Se ha reportado la producción de fitohormonas y específicamente de citocininas en bacterias, ya sea patógenos vegetales, simbióticas o PGPR's. Por ejemplo, *Rhodococcus fascians* y *Rhizobium* spp, utilizan la estrategia que consiste en la producción de una mezcla de CK para inducir la formación de agallas diferenciadas, conocidas como “agallas de hojas” y establecer una simbiosis efectiva con la planta hospedero, los patógenos vegetales: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia herbicola*, emplean una estrategia basada en la producción de una CK durante el proceso infeccioso (Kabbara et al., 2020).

A su vez las citocininas exógenas producen en bacterias efectos por medios de los que aún es poco lo que se conoce. En *Mycobacterium tuberculosis* las citocininas indujeron la transcripción del gen *rvoO77c* de manera importante, no obstante, no fue dilucidado el mecanismo mediante el cual esto ocurre. Se hizo una búsqueda en el genoma de *M. tuberculosis* de genes que codifican para proteínas con dominios CHASE ya que se estableció que estos dominios entre otros ligan estas hormonas (Pas et al. 2004; Savelieva et al. 2018) sin embargo, ésta resultó infructuosa, en este estudio se determinó que la transcripción mediada por citocininas del gen *rvoO77c* tuvo como efecto un fenotipo de tinción “acid-fast” negativa, lo que indicó que las citocininas afectarían la integridad de la membrana de *M. tuberculosis* (Samanovic et al. 2018).

## **6. Antecedentes directos**

### **6.1 Estudios fenotípicos llevados a cabo con la cepa mutante *cdgD::Km<sup>R</sup>* (12-A).**

En 2015 Gamboa-Pérez generó la mutación por inserción de un casete de kanamicina del gen *cdgD* que codifica para una de las proteínas híbridas reportadas previamente en el genoma de *A. brasiliense* Sp245 nombrada CdgD (Mata et al. 2018). En CdgD están presentes los dominios GGDEF y EAL conservados, lo que *a priori* sugería que ambos dominios podrían ser funcionales, así como los dominios de señalización PAS y CHASE. **Figura 8.**

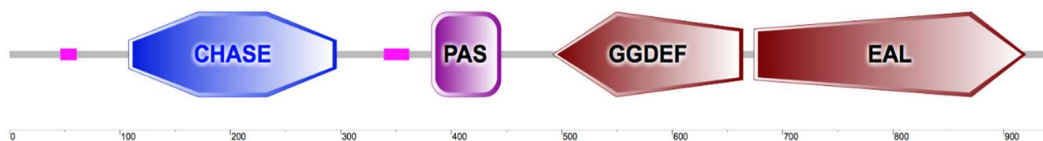


Figura 8.

Análisis de la arquitectura de la proteína codificada por el gen *cdgD* mediante la plataforma SMART.

## 6.2 Efecto de la mutación 12-A en formación de biopelícula y producción de exopolisacáridos.

En 2021 Cruz Pérez *et al.* estudiaron el fenotipo de la mutante isogénica 12-A y verificaron el impacto de la mutación en formación de biopelícula y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) presentando reducción, sin embargo, la mutación del gen *cdgD* no modificó la movilidad. Ambos fenotipos se recobraron mediante la complementación de la mutante **Figura 9**.

Con la complementación en *trans* se observó un incremento significativo en la movilidad al usar como quimio-atrayente al aminoácido prolina, posiblemente debido al número de copias del plásmido, por lo que la carga génica de *cdgD* esta aumentada en la cepa (Cruz-Pérez *et al.* 2021).

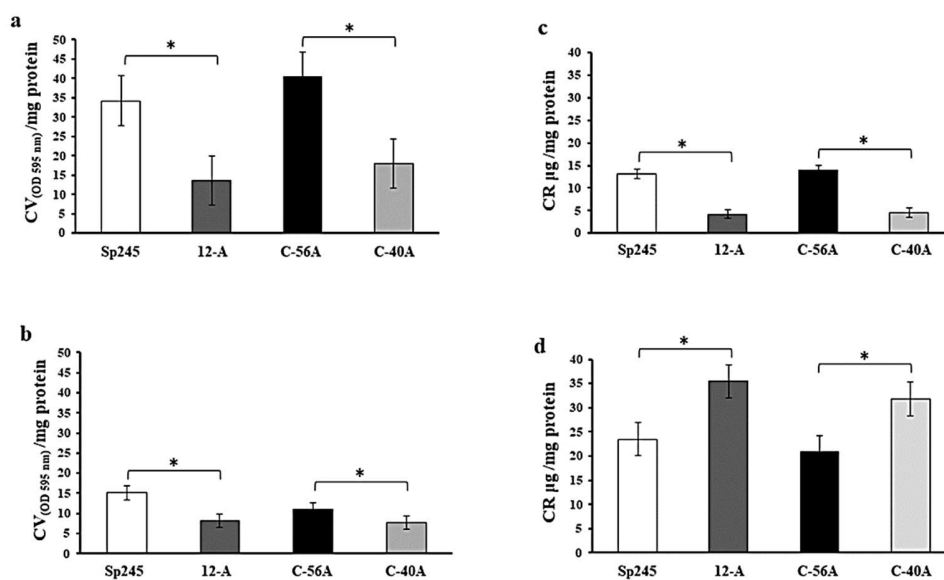


Figura 9.

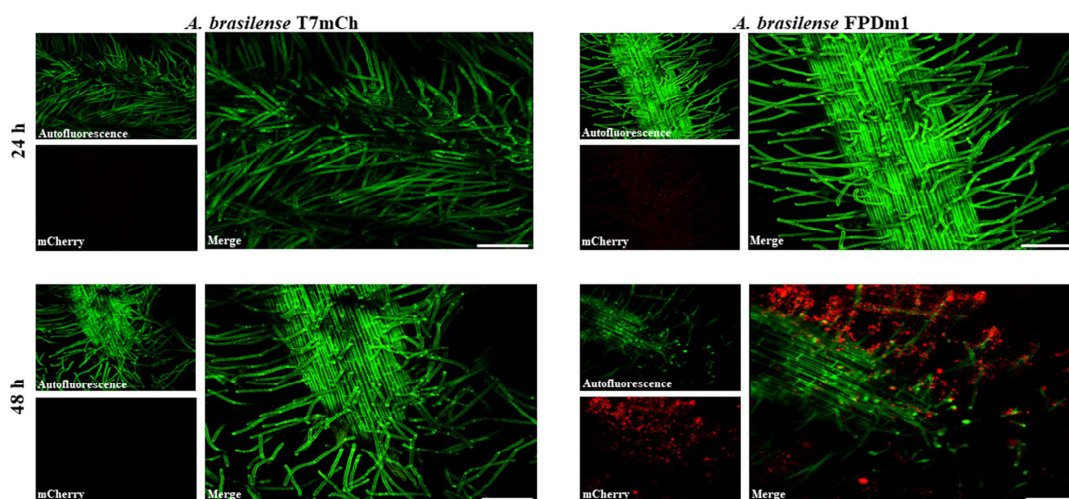
Efectos de la mutación del gen *cdgD* en la producción de biopelículas y EPS determinados en *A. brasilense* WT y cepas derivadas.

a) Determinación de la formación de biopelículas en medio NFB \* suplementado con KNO<sub>3</sub>. b) Determinación de la formación de biopelículas en medio NFB \* suplementado con NH<sub>4</sub>Cl. (c, d) Determinación de producción

de EPS. Cepa silvestre (Sp245), mutante isogénica (12-A), mutante complementada (C-56A) y mutante de vector vacío (C-40A). Tomado de: Cruz-Pérez *et al.* 2021.

Se observó también una disminución estadísticamente significativa en la capacidad de la mutante para colonizar la raíz de trigo (*Triticum aestivum*) medida en UFC/g raíz, la colonización de la bacteria inoculada se restableció en la cepa 12-A complementada con el gen *cdgD*, (Cruz-Pérez *et al.* 2021).

**6.3 Expresión del promotor *cdgD* durante la interacción con *Triticum aestivum*.** (Cruz-Pérez *et al.* 2021). Además, evaluaron la función del promotor del gen *cdgD* en asociación con el trigo por medio de la fusión transcripcional con el gen reportero *mCherry* que codifica la proteína roja fluorescente en el plásmido *A. brasilense* FPDm1, usando como control el plásmido que contiene únicamente el gen *mCherry* sin el promotor (*A. brasilense* T7mCh), observándose la expresión del *pcdgD* revelada por la fluorescencia color rojo (MCherry) a las 48 h, Figura 10.

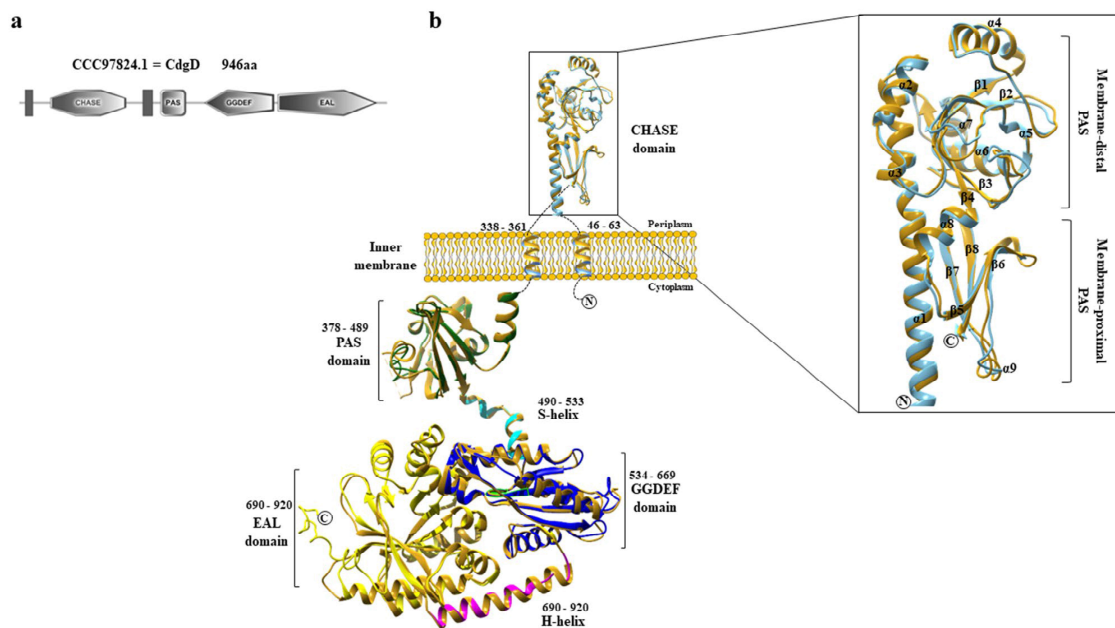


**Figura 10.**

**Expresión de la fusión transcripcional *pcdgD-mCherry* de *A. brasilense* cultivadas bajo condiciones hidropónicas y en las raíces de trigo.** Para la visualización de *A. brasilense* que expresa *mCherry*, las células en las raíces de trigo se observaron a las 24 y 48 h postinoculación. A la izquierda, raíces de plántulas de trigo inoculadas con la cepa control *A. brasilense* T7mCh. A la derecha, las raíces de plántulas de trigo inoculadas con la cepa *A. brasilense* FPDm1. Las células que exhiben fluorescencia por la expresión del gen *mCherry* se visualizaron mediante el microscopio confocal (CLSM). Tomado de: Cruz-Pérez *et al.* 2021.

#### **6.4 Predicción de la estructura proteica de la proteína híbrida CdgD**

Se llevó a cabo la predicción de la estructura por homología de la proteína CdgD como se indica en la **Figura 11**.



**Figura 11.**

**Arquitectura estructural, organización de dominios y modelado por homología de la proteína CdgD de *A. brasilense* Sp245.** (a) Dominios CdgD determinados por el servidor SMART, con una secuencia de 946 residuos de aminoácidos. (b) Representación de la proteína CdgD con su dominio sensor CHASE, dos dominios transmembranales (TMD), PAS, GGDEF, y EAL, la hélice S y la hélice H conectando segmentos cruciales para la dinámica de la proteína. Superposición de las estructuras de los dominios de detección periplásmicos y los dominios transmembranales de CdgD que muestran el dominio CHASE de PcrK (histidin cinasa de *X. campestris* pv *campestris*, código PDB 6K62) en oro y el dominio CHASE de CdgD en celeste. cRbdA de *P. aeruginosa* (código PDB 5XGB), que se muestra en oro, se comparó con la región citoplasmática de CdgD. El dominio PAS es verde, GGDEF es azul, y EAL es amarillo y el S-helix y H-helix son cian y magenta, respectivamente. Los pliegues no incluidos en el modelo estructural se representan por líneas discontinuas. Los sitios N y C terminal se indica. Amplificación del dominio CHASE que muestra los subdominios PAS distales a la membrana y los subdominios PAS proximales a la membrana, en los que se indican las hélices  $\alpha$  y las cadenas  $\beta$ . CdgD y PcrK son azul claro y dorado, respectivamente. Tomado de: Cruz-Pérez *et al.* 2021.

Todos los datos obtenidos en el estudio de la proteína CdgD conducen a profundizar el papel del dominio de señalización CHASE en la regulación de las funciones antagónicas de la proteína DGC y PDE. El cual será el motivo de estudio de la presente propuesta.

## 7. Justificación

*Azospirillum* es una PGPR, y es un modelo ampliamente estudiado en cuanto a su asociación con la planta. Sin embargo, los componentes fisiológicos y genéticos que regulan los mecanismos de movilidad y formación de biopelícula, fundamentales para la supervivencia de la bacteria están aún poco analizados. Es importante estudiar los mecanismos de regulación del di-GMP-c por lo que se propone que los genes que codifican para proteínas con dominios GGDEF- EAL y dominios de señalización CHASE contribuirán en las

bacterias que habitan la rizosfera de las plantas para responder a su entorno de manera más efectiva.

## 8. Objetivo General.

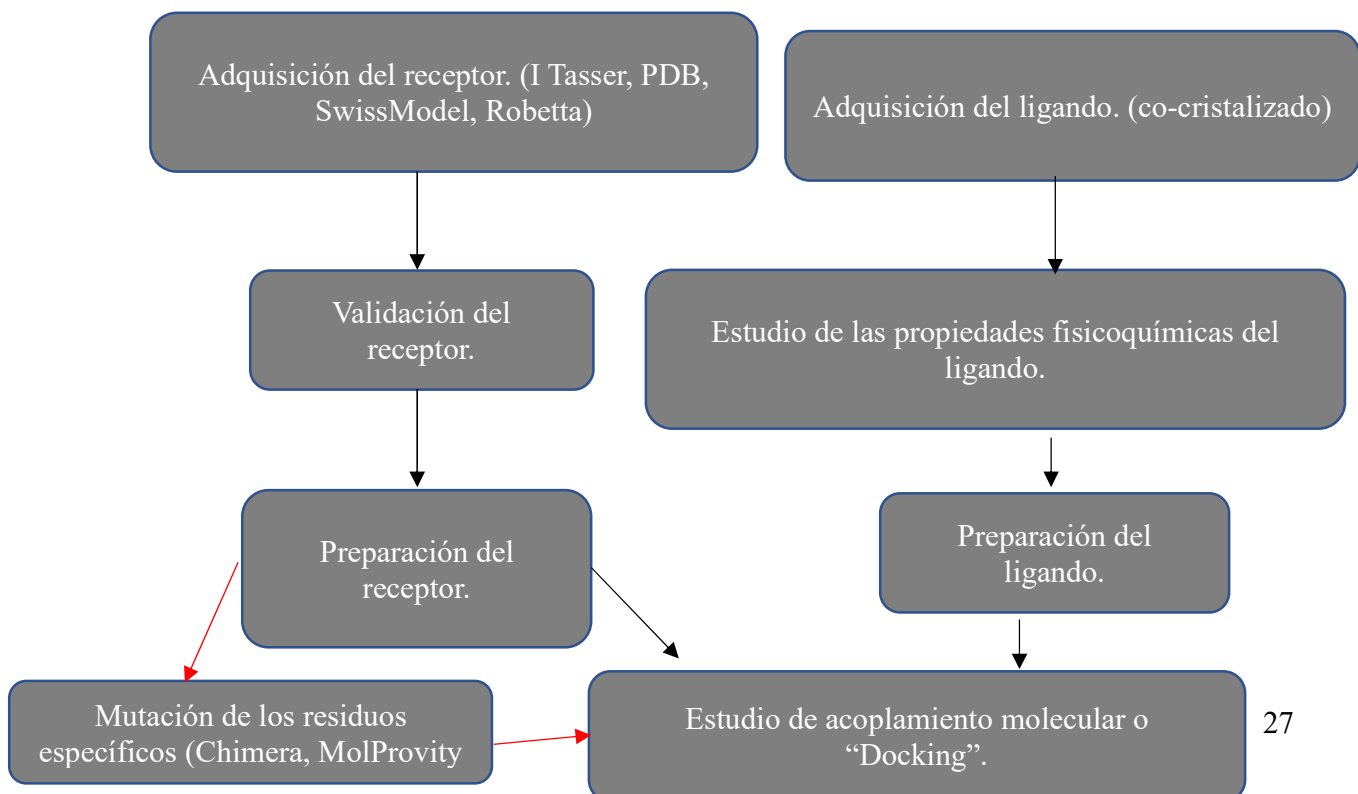
Estudiar del dominio CHASE de la proteína híbrida CdgD de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

### 8.1 Objetivos particulares

1. Realizar estudios bioinformáticos de alineamiento y empalme de estructuras con el dominio CHASE de CdgD.
2. Estudiar de acoplamiento molecular, “docking” con el dominio CHASE nativo
3. Generar mutaciones de residuos conservados de aminoácidos *in silico* sitio específica del dominio CHASE.
4. Realizar estudios de acoplamiento molecular con las mutantes *in silico* generadas.
5. Realizar una búsqueda en las bases de datos para encontrar probables proteínas con dominios CHASE en su arquitectura modular en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245.

## 9. Esquema de trabajo.

Proceso llevado a cabo para los estudios de acoplamiento molecular.



## 9.1 Materiales y métodos

### 9.1.1 Herramientas bioinformáticas.

**Clustal omega:** Es un programa de alineamiento de secuencias múltiples que utiliza árboles guía sembrados y técnicas de perfil-perfil HMM para generar alineamientos entre tres o más secuencias. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

**UCSF Chimera:** Es un programa para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, incluidos mapas de densidad, trayectorias y alineamientos de secuencias. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

**I-Tasser:** Por sus siglas en inglés (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) es un enfoque jerárquico para la predicción de la estructura proteica y la anotación de función basada en la estructura. Primero identifica las plantillas estructurales de la PDB mediante el enfoque de múltiples subprocesos LOMETS, con modelos atómicos de longitud completa construidos mediante simulaciones iterativas de ensamblaje de fragmentos basadas en plantillas. Luego, se obtienen conocimientos sobre la función del objetivo reenhebrando los modelos 3D a través de la base de datos de funciones de proteínas BioLiP. <https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/> (Roy et al., 2010)

**SMART:** Por sus siglas en inglés (Simple Modular Architecture Research Tool) permite la identificación y anotación de dominios genéticamente móviles y el análisis de arquitecturas de dominio. Son detectables más de 500 familias de dominios. Estos dominios están ampliamente anotados con respecto a las distribuciones filéticas, la clase funcional, las estructuras terciarias y los residuos funcionalmente importantes. Cada dominio que se encuentra en una base de datos de proteínas no redundante, así como los parámetros de búsqueda y la información taxonómica se almacenan en un sistema de base de datos relacional. <http://smart.embl-heidelberg.de/>

**Phyre2:** Es un conjunto de herramientas disponibles en la web para predecir y analizar la estructura, función y mutaciones de las proteínas. El objetivo de Phyre2 es proporcionar a los usuarios una interfaz simple e intuitiva para las herramientas de bioinformática de proteínas de última generación. <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>

**Expasy:** Es el portal de recursos bioinformáticos del Instituto Suizo de Bioinformática SIB. Es un portal ampolio e integrador que brinda acceso a más de 160 bases de datos y herramientas de software, desarrolladas por SIB Groups y que respaldan una variedad de dominios de investigación clínica y de ciencias de la vida, desde genómica, proteómica y

biología estructural, hasta evolución y filogenia, biología de sistemas y química médica.

<https://www.expasy.org/about>

**PDB:** Este recurso está impulsado por el archivo de información de Protein Data Bank sobre las formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos y ensamblajes complejos que ayuda a los estudiantes e investigadores a comprender todos los aspectos de la biomedicina y la agricultura. El RCSB PDB se basa en el análisis de los datos mediante la creación de herramientas y recursos para la investigación y la educación en biología molecular, biología estructural, biología computacional y más. <https://www.rcsb.org/>

**NCBI:** El Centro Nacional de Información Biotecnológica promueve la ciencia y la salud al brindar acceso a información biomédica y genómica. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**AutoDockVina:** AutoDock Vina es un programa de código abierto para realizar acoplamiento molecular. Fue diseñado e implementado por el Dr. Oleg Trott en el Laboratorio de Gráficos Moleculares del Instituto de Investigación Scripps. <http://vina.scripps.edu/> (Trott & Olson, 2010).

**ADT(Auto Dock Tools):** Es un software gratuito para AutoDock desarrollada por el mismo laboratorio que desarrolla AutoDock. Puede ser usado para configurar, ejecutar y analizar acoplamientos de AutoDock y mapas de afinidad de AutoGrid de isocontour, así como para calcular superficies moleculares, mostrar cintas de estructuras secundarias, calcular enlaces de hidrógeno entre otras muchas funciones. <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>

**AutoDock4:** AutoDock es un conjunto de herramientas de acoplamiento automatizadas. Está diseñado para predecir cómo moléculas pequeñas, como sustratos o candidatos a fármacos, se unen a un receptor de estructura 3D conocida.

AutoDock 4 en realidad consta de dos programas principales: autodock realiza el acoplamiento del ligando a un conjunto de cuadrículas que describen la proteína objetivo; y autogrid calcula previamente estas cuadrículas.

**LigPlot:** Genera automáticamente diagramas esquemáticos de interacciones proteína-ligando para un archivo PDB determinado. Las interacciones mostradas son las mediadas por enlaces de hidrógeno y por contactos hidrófobos. Los enlaces de hidrógeno están indicados por líneas discontinuas entre los átomos involucrados, mientras que los contactos hidrófobos están representados por un arco con radios que irradian hacia los átomos del ligando con los

que contactan. Los átomos contactados se muestran con radios que se irradian hacia atrás.

<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>

**Pymol:** PyMOL es un sistema de visualización molecular patrocinado por el usuario sobre una base de código abierto, mantenido y distribuido por Schrödinger. <https://pymol.org/2/>

**MolProbity:** Es un sistema de validación de modelos ampliamente utilizado para estructuras de proteínas y ácidos nucleicos. Se basa en el trabajo de sistemas anteriores como ProCheck, I WhatIf, y Oops, que introdujeron el uso de la validación mediante los criterios de rotameros de cadena lateral y diagrama de Ramachandran. Complementa los sistemas para la validación de datos, y la coincidencia de modelo a datos, como Rfree o residual de espacio real. MolProbity tiene algunas características diseñadas específicamente para cristalografía de rayos X, y también es adecuada y se utiliza para crioEM, neutrones, RMN y modelos computacionales. La característica única de MolProbity consistente en el análisis de contacto de todos los átomos (incluidos los hidrógenos) se describió en 1999, seguida de su rotámero complementario, Ramachandran, y los criterios de desviación de C $\beta$  y el servicio web inicial MolProbity. Validación del esqueleto del ARN, interfaces y conjuntos de RMN. <http://molprobity.biochem.duke.edu/>

**VMD:** Está diseñado para modelar, visualizar y analizar sistemas biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, conjuntos de bicapas de lípidos, etc. Se puede usar para ver moléculas más generales, ya que VMD puede leer archivos estándar de Protein Data Bank (PDB) y mostrar la estructura contenida. VMD proporciona una amplia variedad de métodos para representar y colorear una molécula: puntos y líneas simples, esferas y cilindros CPK, enlaces de regalo, tubos y cintas de la columna vertebral, dibujos animados y otros. VMD se puede utilizar para animar y analizar la trayectoria de una simulación de dinámica molecular (MD). En particular, VMD puede actuar como una interfaz gráfica para un programa MD externo mostrando y animando una molécula sometida a simulación en una computadora remota.

<https://www.ks.uiuc.edu/>

**Pdb2Pqr:** El uso de métodos de solvatación continuos como APBS requiere datos estructurales precisos y completos, así como parámetros del campo de fuerza, como cargas atómicas y radios. Desafortunadamente, el paso limitante en los cálculos electrostáticos continuos es a menudo la adición de coordenadas atómicas faltantes a las estructuras moleculares del Protein Data Bank y la asignación de parámetros a estas estructuras. Para

abordar este problema, se desarrolló PDB2PQR. Este software automatiza muchas de las tareas comunes de preparar estructuras para cálculos de solvatación continua, así como muchos otros tipos de modelado, análisis y simulación de estructuras biomoleculares. Estas tareas incluyen: los análisis de solvatación biomolecular y electrostática a la comunidad biomédica. <https://www.poissonboltzmann.org/>

**APBS:** APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) resuelve las ecuaciones de la electrostática continua para grandes ensamblajes biomoleculares. Este software fue diseñado “desde cero” utilizando principios de diseño moderno para garantizar su capacidad para interactuar con otros paquetes computacionales y evolucionar a medida que los métodos y las aplicaciones cambian con el tiempo. El código APBS viene acompañado de una extensa documentación tanto para usuarios como para programadores y está respaldado por una variedad de utilidades para preparar cálculos y analizar resultados. Por último, la licencia APBS de código abierto y gratuita garantiza su accesibilidad a toda la comunidad biomédica. <https://www.poissonboltzmann.org/>

**Robetta:** Robetta es un servicio de predicción de la estructura de proteínas que se evalúa continuamente a través de CAMEO. Las características incluyen un método basado en aprendizaje profundo relativamente rápido y preciso, TrRosetta, y una interfaz de envío interactiva que permite alineaciones de secuencia personalizadas para modelado de homología, restricciones, fragmentos locales y más. Puede modelar complejos de cadenas múltiples utilizando modelos comparativos y ofrece la opción de muestreo a gran escala. Utiliza la base de datos de plantilla PDB100, que se actualiza semanalmente, una base de datos de modelo basada en coevolución (MDB), y también ofrece la opción de plantillas personalizadas. <https://robeta.bakerlab.org/>

**MiST 3.0:** MiST 3.0 proporciona perfiles de transducción de señales de más de 125.000 genomas de bacterias y arqueas. Esta versión de la base de datos es el resultado de un escalamiento sustancial para acomodar datos genómicos microbianos en constante crecimiento. La base de datos se puede explorar utilizando la interfaz web o una API REST, que alimenta este sitio web y proporciona acceso programático a los datos subyacentes.

La primera versión de la base de datos MiST se publicó en 2007 para identificar y documentar los sistemas de transducción de señales en microbios y proporcionar un portal conveniente para que los científicos exploren este conocimiento. Aunque MiST3 se centra

principalmente en la transducción de señales, almacena características precalculadas de todas las proteínas codificadas en los genomas NCBI RefSeq. Todos los genomas NCBI RefSeq y las proteínas codificadas se pueden explorar utilizando funciones convenientes implementadas en MiST sin ejecutar software externo <https://mistdb.com>

## 10. Resultados.





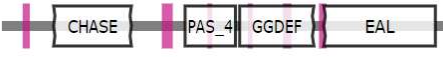

### 10.1 Resultados de los estudios *in silico*.

#### 10.1.1 Análisis *in silico* del genoma de *A. baldaniorum* de genes que codifican proteínas que contienen dominios CHASE.

En *A. baldaniorum* se localizaron seis proteínas con un dominio CHASE en su arquitectura modular, empleando la plataforma MIST-3 (Microbial Signal Transduction 3.0), este análisis incluyó a la proteína híbrida anotada como CdgD tema de este estudio ubicada penúltima en la **Tabla 4** en donde se exponen los resultados de este análisis.

**Tabla 4.**

**Resumen de la búsqueda llevada a cabo en el genoma de *A. baldaniorum* Sp245.**

Ubicación en el genoma	Número de acceso MIST	Tamaño	Arquitectura modular
P3	WP_014198967.1	499 aa (1500 bp)	
P5	WP_014242590.1	680 aa (2043 bp)	
Cromosoma	WP_082188152.1	632 aa (1899 bp)	
Cromosoma	WP_088123923.1	746 aa (2241 bp)	
Cromosoma	WP_014240087.1	946 aa (2841 bp)	
Cromosoma	WP_082188123.1	624 aa (1875 bp)	

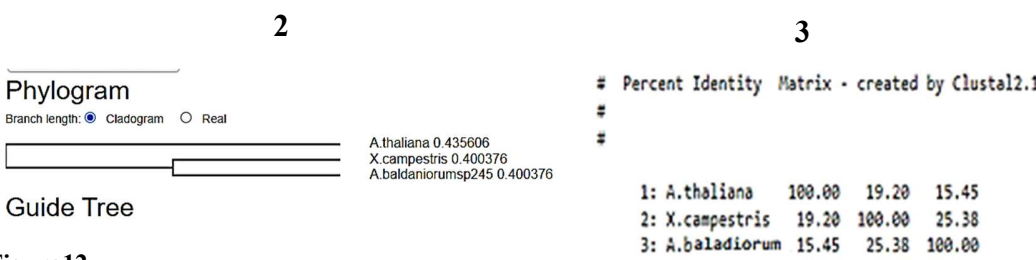
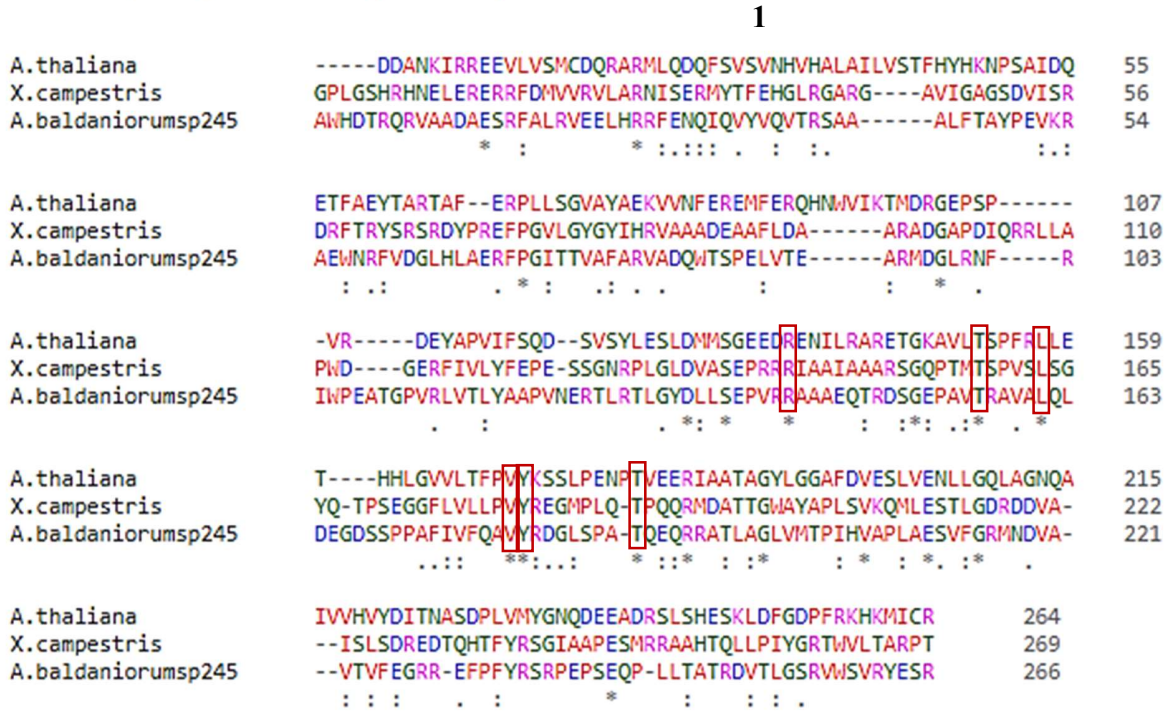
#### 10.1.2 Alineamientos.

##### 10.1.2.1 Alineamiento de las regiones N-terminales de *A. thaliana*, *X. campestris* y *A. baldaniorum* sp 245.

Este alineamiento se realizó como un primer acercamiento con el propósito de obtener indicios de motivos conservados que, en conjunto con los análisis de las interacciones analizadas en los estudios de acoplamiento molecular, aporten información orientada a determinar los aminoácidos que intervienen en la unión de los ligandos. Y sus posteriores cambios nos ayudarán a analizar el impacto de estos en la interacción ligando-dominio. Así

mismo, nos indica el grado de identidad que existe entre los dominios CHASE de los tres modelos analizados y la relación filogenética entre los mismos.

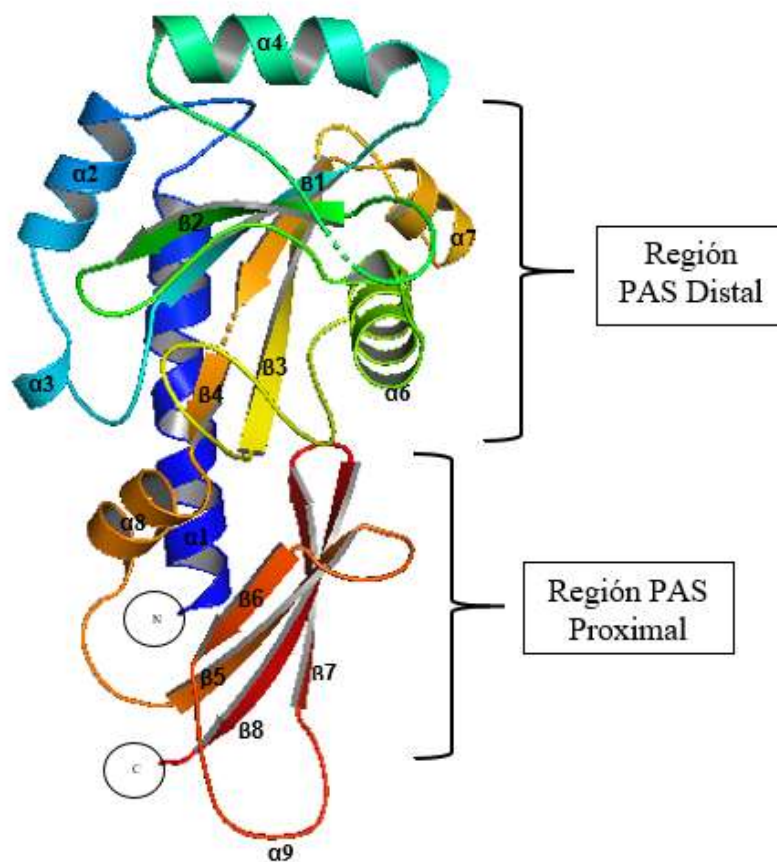
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment



**Figura 12**  
**Alineamiento de dominios CASE de tres modelos.**  
**Panel 1.** Alineamiento de aminoácidos de los dominios CHASE de *A. thaliana*, *X. campestris* y *A. baldaniorum* Sp245. Se indica la región N-terminal de las proteínas, los residuos de aminoácidos marcados con un asterisco están conservados en las tres proteínas. **Panel 2.** Cladograma que hace patente la distancia filogenética de *A. thaliana* un modelo vegetal que se encuentra en un clado distinto al de *X. campestris* y *A. baldaniorum* Sp245. **Panel 3.** Se muestra la matriz del porcentaje de identidad de las proteínas. Los resultados se obtuvieron mediante la herramienta bioinformática Clustal Omega.

### 10.2 Predicción de la estructura proteica del dominio CHASE de la proteína CdgD.

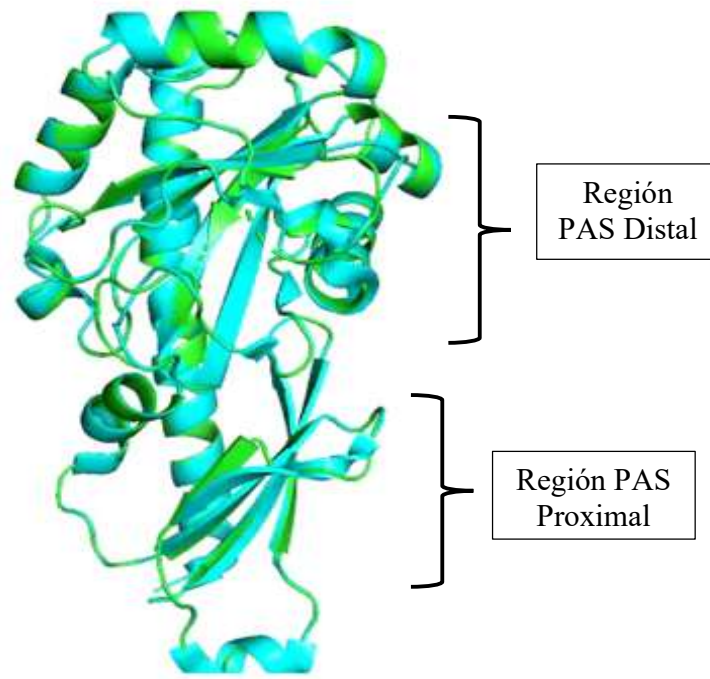
Se realizó precedentemente la estructura tridimensional del dominio CHASE de CdgD utilizando la herramienta de modelado de la plataforma I-Tasser (Cruz-Pérez *et al.*2021). Con el fin de validar y corroborar los resultados del citado estudio, se llevó a cabo la predicción de la estructura de este dominio utilizando las herramientas de la plataforma Swiss-Model y los resultados se muestran a continuación en la **Figura 13**.



**Figura 13. Estructura tridimensional del dominio CHASE de la proteína CdgD.**

Obtenida por homología mediante la plataforma Swiss Model y utilizando el cristal del dominio CHASE anotado en la base de datos PDB como 6K62 de la proteína PerK, donde se muestran las  $\alpha$  hélices (9) y las  $\beta$ -plegadas (8). Se indica el subdominio PAS distal y el subdominio PAS proximal.

### 10.3 Estudio de empalme de estructuras del dominio CHASE mediante el software PyMol.



**Figura 14.**

#### **Empalme de estructuras del dominio CHASE.**

Análisis llevado a cabo empleando como modelo al cristal de PDB 6K62 de la proteína PcrK de *X. campestris* patovar *campestris*. En verde se muestra el modelo de *Xanthomonas* y en azul el modelo correspondiente a *A. baldaniorum* Sp245, con el RMSD de 0.138 Å. Se indican el estudio realizado con el software PyMol. se muestran las  $\alpha$  hélices (9) y las  $\beta$ -plegadas (8). Se indica el PAS distal y el PAS proximal.

### 10.4 Estudios de acoplamiento molecular “Docking”.

Se muestran los resultados de los estudios de acoplamiento molecular efectuados para el presente estudio, los cuales se llevaron a cabo con tres propósitos. El primero contar con resultados de tamizado evaluando diversos ligandos y su unión al dominio CHASE de CdgD, e identificar el ligando con el parámetro termodinámico mejor y consistente con lo esperado, de acuerdo con las referencias de *A. thaliana* y *X. campestris*. El segundo propósito es analizar las interacciones ligando-receptor, lo cual aporta valiosa información para determinar las mutaciones a realizar *in silico*. Por último, utilizamos las estructuras con las mutaciones efectuadas *in silico* para llevar a cabo estudios de acoplamiento molecular, y

evaluar su impacto en la interacción ligando-receptor. Estudio que nos indicaría la pauta a seguir en el estudio experimental *in vitro*.

#### 10.4.1 Estudio de acoplamiento molecular de la Prolina como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor.

En el estudio de Cruz-Perez *et al.* (2021), se analizó el impacto de la mutación del gen *cdgD* en movilidad, donde se hizo evidente el aumento en la cepa complementada en *trans* con prolina como atrayente. Por la cual, consideramos relevante para este estudio evaluar a la prolina como ligando específico de la región amino terminal de CdgD.

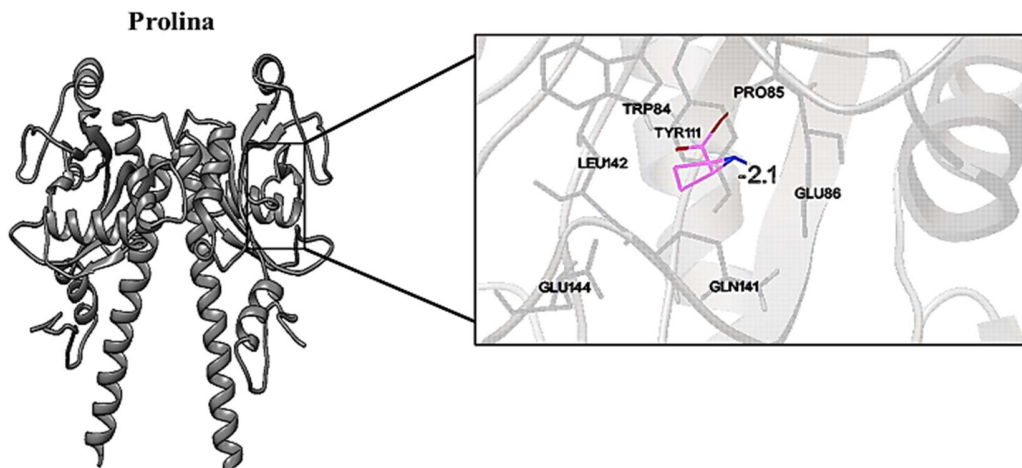


Figura. 15.

Imagen obtenida del análisis de acoplamiento de la prolina al dominio CHASE de la proteína CdgD de *A. baldaniorum Sp245*. En la ampliación ("zoom"), se muestra la estructura del aminoácido prolina (color rosa) acoplada al sitio de unión en la región del PAS distal del dominio CHASE de CdgD. Se indican siete aminoácidos de la cavidad con los que está interactuando directamente la prolina. Con un  $\Delta G^\circ = -2.1$  kcal/mol, la unión ligando-receptor es termodinámicamente favorecida. Este estudio de acoplamiento se efectuó usando el software denominado **Autodock Vina**.

#### 10.4.2 Estudio de acoplamiento molecular de la trans-zeatina como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor.

En los estudios de Hothorn *et al.* (2011) se reportó que las citocininas, tanto naturales como sintéticas se unen a la región periplasmática de AHK4, mostrando diversas afinidades, siendo la tZ y la iP las hormonas vegetales que se unieron con mayor afinidad, y que éstas participan en la interacción bacteria planta (Kudoyarova *et al.* 2019). Entonces considerando las similitudes estructurales encontradas entre los dominios CHASE de AHK4 y CdgD se estimó preponderante evaluar *in silico* la unión entre la tZ y CdgD.

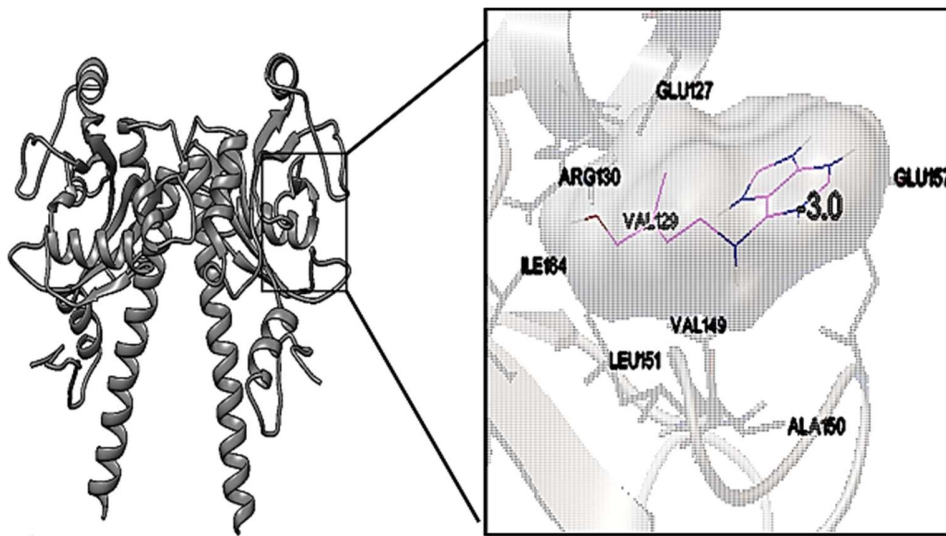
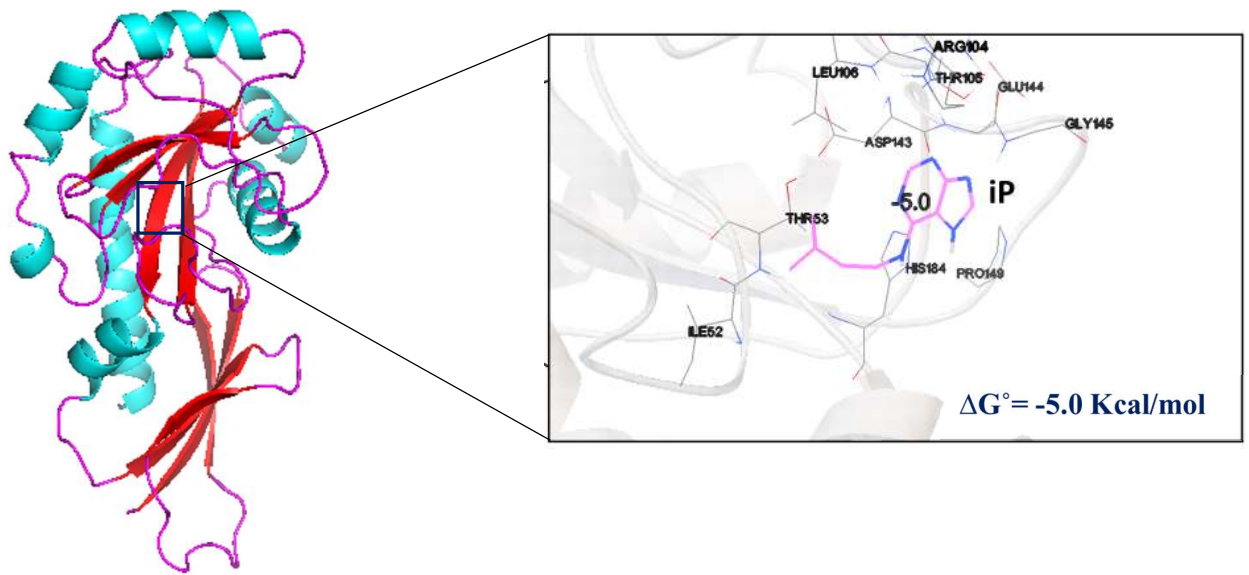


Figura 16.

Imagen obtenida del análisis de acoplamiento de la tZ al dominio CHASE de la proteína CdgD de *A. baldaniorum* Sp 245. En la ampliación ("zoom"), se muestra la estructura de la citocinina (de color rosa) acoplada al sitio de unión en la región del PAS distal del dominio CHASE de CdgD. Se indican ocho aminoácidos de la cavidad, con los que está interactuando directamente. Con un  $\Delta G^\circ = -3.0$  kcal/mol la unión ligando-receptor es termodinámicamente favorecida. Este estudio de acoplamiento se efectuó usando el software denominado **Autodock Vina**.

#### 10.4.3 Estudio de acoplamiento molecular de la iP como ligando y el dominio CHASE de la proteína CdgD como receptor.

Tomando los datos de Hothorn *et al.* (2011) y Chen *et al.* (2019), se analizó la unión entre iP y los respectivos dominios CHASE de las proteínas AHK4 y PcrK y, con el fin de apuntalar respuestas del comportamiento de la interacción ligando-CHASE, procedimos a realizar los siguientes análisis de acoplamiento molecular como se indica.

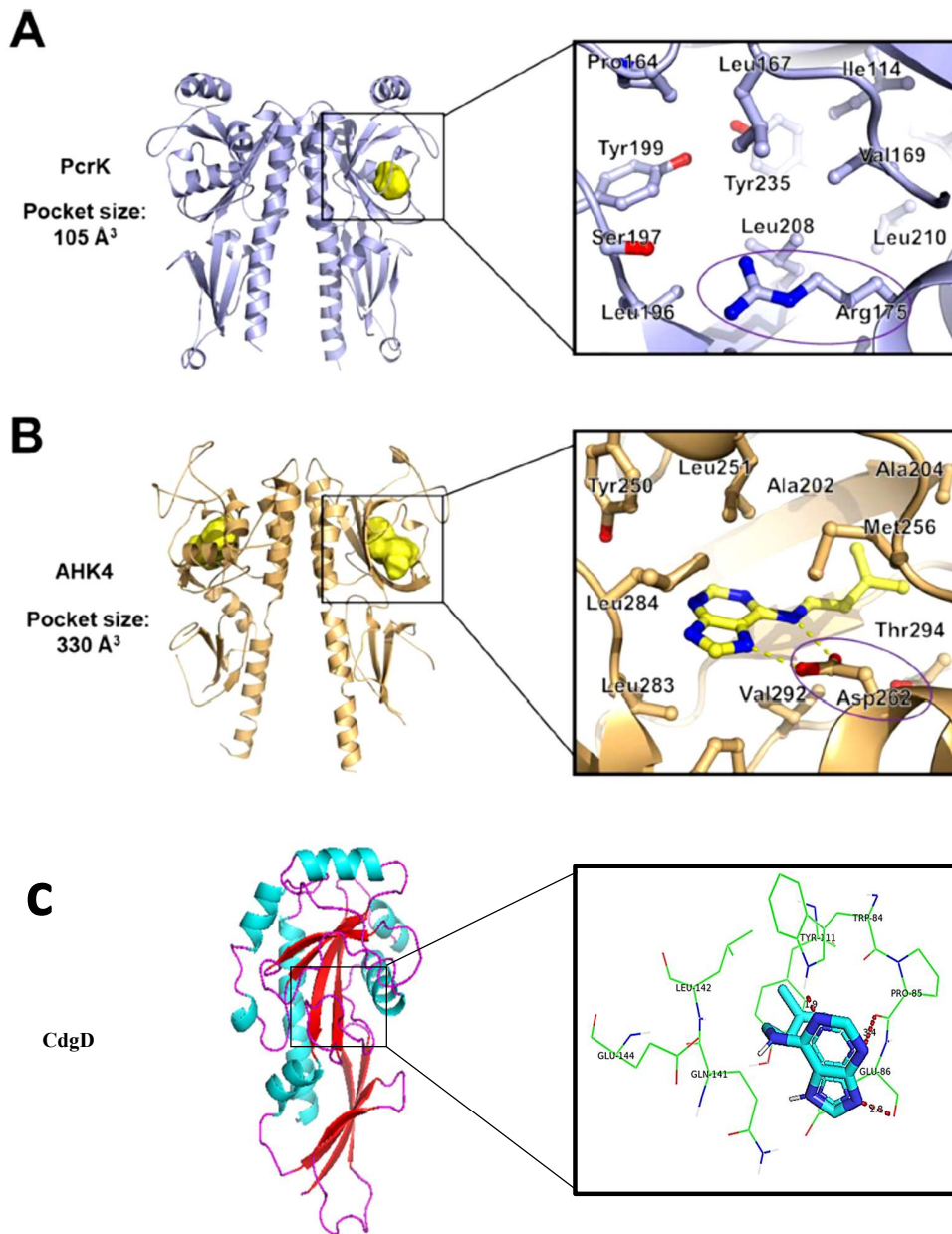


**Figura 17.**

**Imagen obtenida del análisis de acoplamiento de la Isopentil adenina al dominio CHASE de la proteína CdgD de *A. baldaniorum* Sp 245.** En la ampliación (zoom), se muestra la estructura de la citocinina (color rosa) acoplada al sitio de unión en la región del PAS distal del dominio CHASE de CdgD. Se indican nueve aminoácidos de la cavidad con los que está interactuando directamente. El  $\Delta G^\circ = -5.0$  kcal/mol de unión del ligando al receptor es termodinámicamente favorecida. Este estudio de acoplamiento se efectuó usando el software denominado **Autodock Vina**.

#### **10.4.4 Determinación de las mutantes a efectuar.**

Con el propósito de determinar los aminoácidos que sería pertinente cambiar de forma específica, con el fin de generar mutantes que afectaran la unión del ligando al dominio CHASE, procedimos a realizar análisis bioinformático. Previamente se tomó en consideración el alineamiento Figura 12 Panel,1; así como los datos obtenidos de los aminoácidos altamente conservados que interactúan con el ligando iP y comparando entre los dos modelos estudiados AHK4 y PcrK y CdgD.



**Figura 18**

**Comparación de tres modelos en la unión CHASE-iP.** En A y en B se aprecian los dominios CHASE de AHK4 y de PcrK alojando a iP en la cavidad ubicada en la región PAS distal de los mismos, en las ampliaciones se muestran los aminoácidos que interactuarían con la iP durante la unión (Chen *et al.*, 2019; Hothorn *et al.*, 2011). En C tenemos a la iP alojada en la descrita cavidad de CdgD y los aminoácidos que interactuarían directamente efectuado mediante PyMol.

En la **Tabla 5** se indican los aminoácidos que se conservan en la interacción con iP tanto en AHK4, PcrK y CdgD, y en rojo los aminoácidos que se seleccionaron para su mutación *in vitro* por Chen *et al.* e *in silico* para este estudio.

**Tabla 5**

**Aminoácidos conservados en la unión ligando receptor.**

\*En rojo aparecen los que se mutaron.

Aminoácido	<i>A. thaliana</i>	<i>X. campestris</i>	<i>A. baldaniorumSp245</i>
Tyr	250	199, 235	111
Leu	251,283,284	167,196*,208, 210	142
Pro		164	85

**10.4.5 Análisis de las mutantes *in silico* en la interacción con los ligandos en estudio.**

Los estudios de acoplamiento molecular constituyen una herramienta potente y ampliamente utilizada actualmente, que permite predecir la posibilidad de una eventual unión proteína ligando, mediante el análisis de la termodinámica de la unión en distintas regiones del receptor y tomando en cuenta diversas posiciones de unión que podría adoptar el ligando. Por lo que, efectuamos tres mutaciones y estudios de acoplamiento molecular con éstas como receptor y a las citocininas iP y tZ, así como el aminoácido prolina como ligandos. El objetivo de estos estudios es el de predecir la manera en la que afectarían estas mutaciones en la interacción ligando receptor, y así inferir que aminoácidos serán pertinente sustituir en estudios posteriores llevados a cabo *in vitro*.

#### 10.4.6 Acoplamiento molecular con trans-zeatina como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación *in silico* R<sup>130</sup>A como receptor.

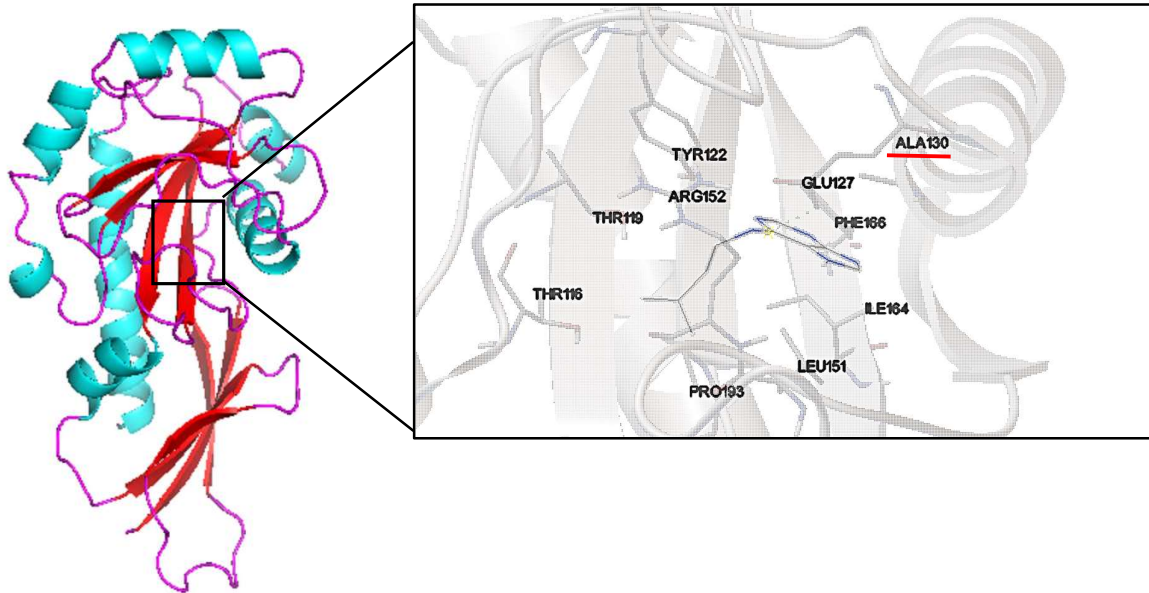


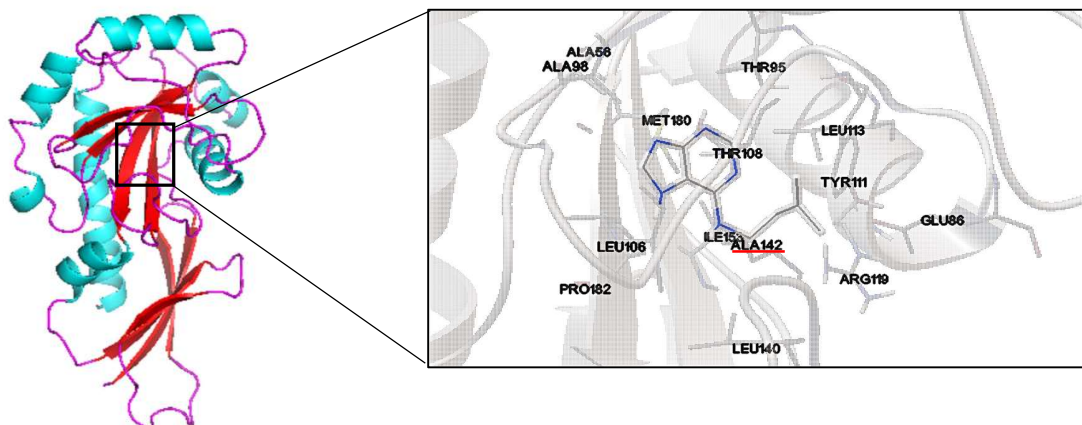
Figura 19.

Imagen que muestra a la tZ, acoplada al sitio de unión en la región conocida como PAS distal de CdgD con una mutación puntual efectuada *in silico* mediante el software Chimera.

Se muestran también los aminoácidos con los que se encuentra interactuando directamente que suman un total de diez. El  $\Delta G^\circ$  de unión es de  $-5.05$  Kcal/mol. El acoplamiento se efectuó usando el software Autodock 4.2

#### 10.4.7 Acoplamiento molecular con iP como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación L<sup>142</sup>A como receptor.

El estudio se efectuó para evaluar el impacto de la mutación en la unión ligando receptor, CdgD-iP. En la figura se esquematiza la iP, acoplada al sitio de unión en el dominio PAS distal de CdgD y la mutación puntual efectuada *in silico* mediante el software Chimera, se muestran también los aminoácidos con los que se encuentra interactuando directamente que suman un total de catorce. El  $\Delta G^\circ$  de unión es de  $-1.66$  Kcal/mol. Este estudio de acoplamiento se efectuó usando el software denominado Autodock vina.



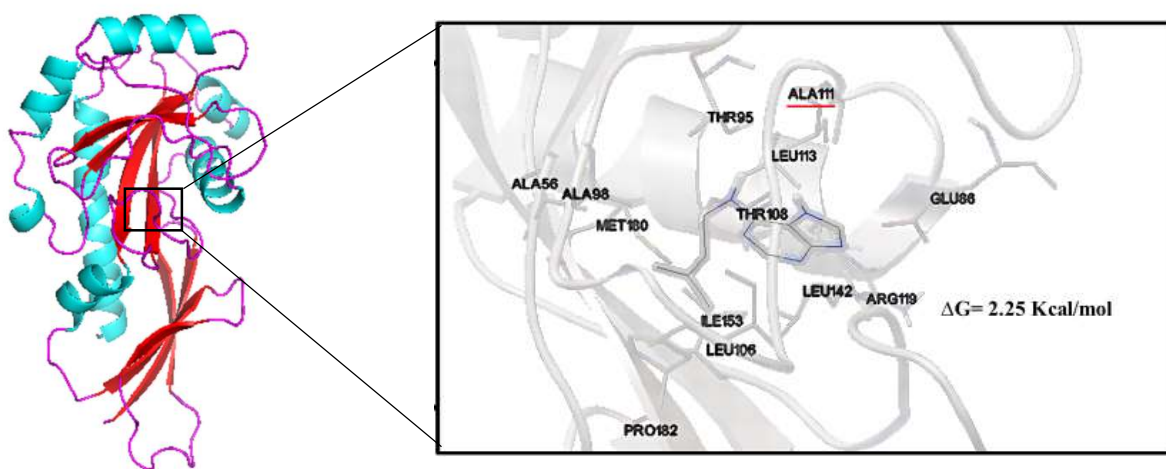
**Figura 20.**

**Imagen que muestra a la iP, acoplada al sitio de unión en la región conocida como PAS distal de CdgD con una mutación puntual efectuada *in silico* mediante el software Chimera.**

Se muestran también los aminoácidos con los que se encuentra interactuando directamente que suman un total de catorce. El  $\Delta G^\circ$  es de **-1.66 Kcal/mol**. El acoplamiento se efectuó usando el software **Autodock vina**.

#### **10.4.8 Acoplamiento molecular con iP como ligando y con el dominio CHASE de la proteína CdgD con la mutación Y<sup>111</sup>A como receptor.**

Este estudio se efectuó con el fin de evaluar el impacto de la mutación en la unión ligando receptor, CdgD-iP justo como la mostrada en el inciso anterior.



**Figura 21.**

**Imagen que muestra a la iP, acoplada al sitio de unión en la región conocida como PAS distal de CdgD con una mutación puntual efectuada *in silico* mediante el software Chimera.**

Se muestran también los aminoácidos con los que se encuentra interactuando directamente que suman un total de trece. Obteniéndose un  $\Delta G^\circ = 2.25$  Kcal/mol, Este estudio de acoplamiento se efectuó usando el software denominado **Autodock 4.2**.

## **11. Discusión.**

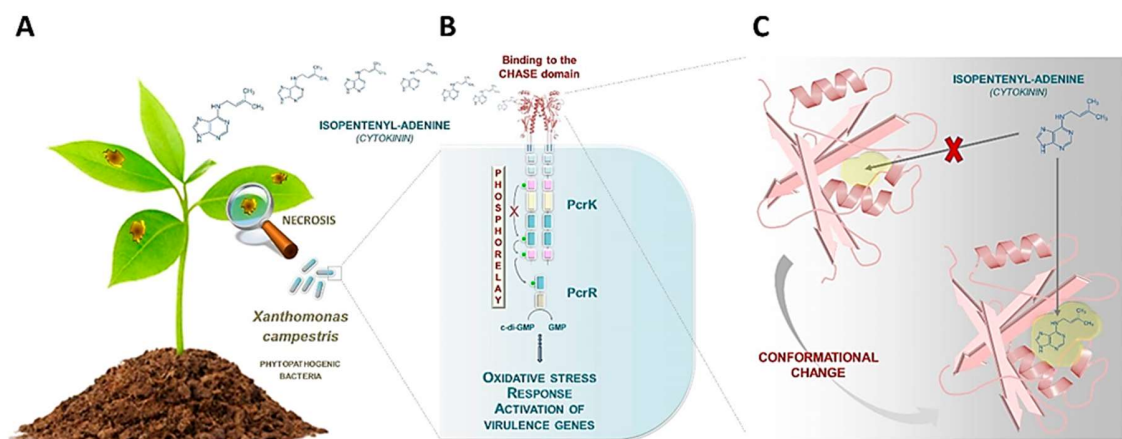
Localizamos en el genoma de *A. baldaniorun* Sp245 un total de 5 genes que presuntivamente codifican a proteínas que, en su arquitectura modular incluyen un LBD (Ligand Binding Domain, por sus siglas en inglés) tipo CHASE, adicionales a la proteína CdgD, **Tabla 4**. Como lo han indicado Pas et al., (2004) y Zhulin et al., (2003), existen distintos tipos de dominios CHASE basados en su estructura secundaria, en este trabajo se encontraron tres proteínas asociadas al dominio CHASE, dos a CHASE2 y una a CHASE3. Estos dominios presentan importantes diferencias en su estructura y en su función, ya que unen distintos ligandos y participarían en diversos procesos como lo son quimiotaxis, taxis energética, metabolismo y regulación e implicadas en transducción de señales; ya que la unión a un ligando propicia un cambio conformacional en la región citoplasmática de la proteína que

conlleva a activar o inhibir su función catalítica. El dominio CHASE2 se describió como dominio localizado en el N-terminal de la proteína DGC PA0847 de *P. aeruginosa* PAO1 caracterizada por Zhang et al., (2019), que incluye además del dominio CHASE2, dos dominios transmembranales, los dominios HAMP, PAS y GGDEF. Se reportó que cuando la proteína careció del dominio PAS los niveles del di-GMPc no se incrementaban. Sin embargo, al evaluar la respuesta de la cepa nativa y cepas mutantes en la formación de biopelícula y la movilidad, sorprendentemente las mutaciones no impactaron la formación de biopelícula, pero si la movilidad “swarming” de las cepas mutantes, lo que confirma la compleja red mediante la cual en bacterias se regulan los niveles intracelulares del di-GMPc y sus efectos en el fenotipo. Es de interés comentar que se utilizaron diversos ácidos orgánicos y aminoácidos como atrayentes para el ensayo de movilidad, estableciéndose importante información en cuanto a que sería posiblemente el dominio sensor CHASE2 de PA0847 el que estaría interactuando con aminoácidos. En lo que se refiere al dominio CHASE3, sorpresivamente no se encontró entre las proteínas de *A. baldaniorum* Sp245 con dominios CHASE alguno asociado a proteínas de MCP, las cuales se asocian específicamente a este dominio (Zhulin et al., 2003), proteínas que participan en la forma canónica de quimiotaxis. Lo que sugiere que, esta familia de dominios de señalización si participasen en quimiotaxis, lo harían entonces mediante mecanismos distintos en *A. baldaniorum* Sp245, ya que el CHASE3 encontrado se asocia a un dominio de HTPasa, (con posible actividad de ATPasa), **Tabla 4**, la cual contiene un dominio CHASE3 que según lo reportado por Zhulin et al., (2003) presenta similitud con un AHB por sus siglas en inglés (Antiparalel Helical Bundle). Lo que es consistente con lo reportado por (Martin-Mora et al., 2021), quienes indican que la proteína McpN (Proteína de unión a metilos), de *P. aeruginosa* PAO1, contiene un dominio periplasmático de unión a ligando, el cual se cristalizó y estudió como aceptor de nitrato, en condiciones de bajas concentraciones, contrario a lo que generalmente se ha observado; que tendría que ver con quimiotaxis en condiciones de alta concentración del quimio atrayente, esto es sumamente relevante pues si bien Zhulin et al., (2003) indicaron la estructura secundaria y peculiaridades del dominio, Martin-Mora et al., (2021), mostraron el ligando que une y los procesos celulares en los que participaría. Por otra parte, (Ren et al., 2020), mostraron que en el genoma de *Lysobacter enzymogenes* OH11 la presencia de un total de 21 genes que codificarían para proteínas modulares, 6 de ellas híbridas (DGE/PDE).

Entre estos 21 productos génicos, dos llaman especialmente nuestra atención, Le0082 y Le0067 ambas con el motivo GGDEF y CHASE. En cuanto a Le0067, ésta DGC/PDE contiene los dominios CHASE3 (flanqueado por dos dominios transmembranales), GAF\_2 y GGDEF. La mutación de estos genes incrementó la producción de HSAF (por sus siglas en inglés Heat Stable Antifungal Factor). Si bien en el estudio los autores se enfocan en un aspecto biotecnológico, y no analizan los ligandos o señales que los LBD asociados a las proteínas reguladoras del di-GMPc, que estarían detectando en su interacción con la planta. Se constata que los diversos dominios CHASE asociados a las proteínas que regulan el di-GMPc en bacterias que interactúan con las plantas como PGPR, tienen relevancia en el proceso de señalización y/o regulación de la actividad enzimática de los dominios catalíticos.

Es interesante y destacado comentar una importante distinción ya que, en tanto el dominio CHASE de CdgD está asociado a una DGC/PDE, los de las proteínas AHK4 de *A. thaliana* y PcrK de *X. campestris* pv *campestris*, están asociados a cinasas histidínicas (Hothorn et al., 2011; Chen et al., 2019). Dominios tipo CHASE que no fueron descritos en el trabajo pionero de Zhulin *et al.*, (2003). Lo que sugiere la versatilidad de estructuras secundaria y terciaria de los dominios CHASE, además de los dominios a los que se asocia de señalización y enzimáticos y, por consecuente a su función, así como en las vías de señalización en las que intervienen. Como se constata con los datos aportados sobre la proteína PcrK de *X. campestris* pv *campestris*, la cual tendría un mecanismo distinto de reconocimiento de citocininas al de AHK4 de *A. thaliana*, ya que la cavidad del dominio PAS distal del dominio CHASE de PcrK sería muy reducida, lo que la inhabilitaría para alojar a la iP por lo que proponen que si bien esta hormona sería el ligando específico del receptor, el mecanismo de unión implicaría un cambio conformacional del PAS distal provocado por la unión a alguna otra molécula que sería requerida para habilitar este reconocimiento (Savelieva *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017; Wang & Qian, 2019) . Dichos estudios muestran el papel del dominio sensor periplásmico CHASE como receptor de citocininas (iP), y su efecto en la capacidad del modelo para la supervivencia y adaptación. *Xanthomonas campestris*, es el agente causante de la pudrición negra en crucíferas, se presume que la bacteria detectaría estas hormonas vegetales para establecer infección, revelando el probable mecanismo de percepción. **Figura. 22**, (Wang & Qian, 2019). En el sistema regulatorio PcrK / PcrR, la

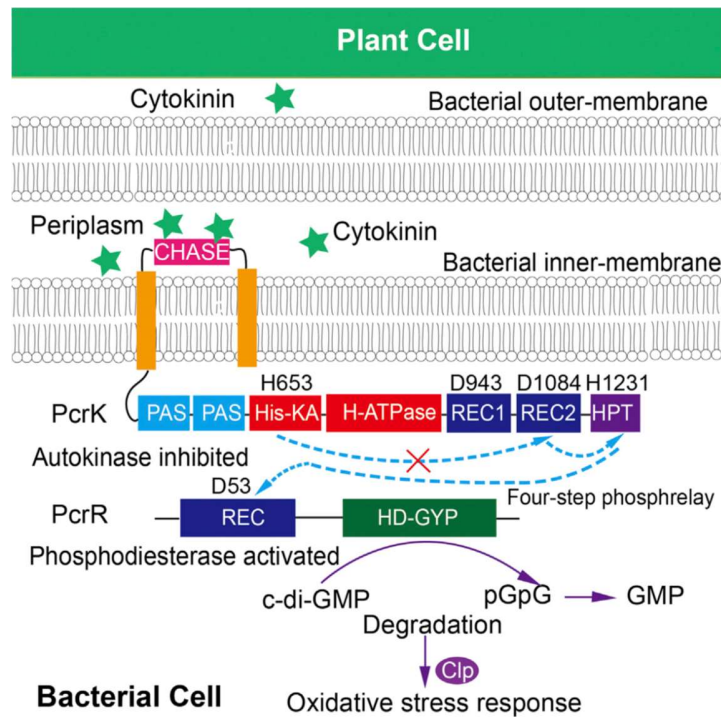
unión de la hormona vegetal a la cinasa histidínica bacteriana PcrK inactiva su actividad de autocinasa, lo que conduce a la desfosforilación del regulador de respuesta PcrR. La actividad fosfodiesterasa de PcrR (cuyo modo activo, es en el estado desfosforilado) regularía los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc, regulándose así la transcripción de 56 genes, incluidos algunos involucrados en resistencia al estrés oxidativo y el gen receptor *ctrA* dependiente de TonB asociado a virulencia (Wang et al., 2017), mejorando así la resistencia bacteriana a las defensas del huésped **Figura. 23**. Lo anterior nos muestra que, si bien las estructuras secundarias están conservadas, no así la secuencia primaria, y las funciones en las que intervienen los dominios CHASE en la señalización.



**Figura 22.**

**Mecanismo propuesto por. Para la unión de iP al receptor.**

A) Planta infectada por *X. campestris* patógeno en crucíferas. B) Unión de la iP a la región periplásmica de PcrK y sus efectos. C) Propuesta en la que se supone un cambio conformacional que habilite la unión PcrK-iP. Tomado de: Chen *et al* 2019.



**Figura. 23.**

**Modelo propuesto de señalización en que interviene el dominio CHASE de *X. campestris*.**

La histidin cinasa bacteriana PcrK detecta específicamente a la citocinina de origen vegetal 2-isopentenyladenina la cual se une al dominio sensor CHASE de PcrK inhibiendo su actividad de autocinasa. PcrK al fosforilar a PcrR regula su actividad de fosfodiesterasa. PcrR degrada al c-di-GMPc para controlar la respuesta bacteriana al estrés por oxidación. Tomado de Wang *et al.*, 2017.

El estudio realizado en nuestro grupo de trabajo al predecir la arquitectura de la proteína DGC/PDE, CdgD en la que se incluyen los dominios CHASE, PAS, GGDEF y EAL, proteína híbrida modular que regula los niveles intracelulares del segundo mensajero di-GMPc en *A. baldaniorum* Sp245 (Cruz-Pérez *et al.*, 2021), implica también la urgencia de avanzar en el mecanismo por medio del cual los dominios de actividades enzimáticas opuestas se regulan. Es así como en este contexto el estudio del dominio CHASE cobra relevancia.

Los análisis llevados a cabo para elucidar desde un enfoque predominantemente *in silico* sobre la región de unión a ligando periplasmática de CdgD, han producido resultados interesantes y relevantes respecto a la posible unión de éste a citocininas, estos análisis se iniciaron llevando a cabo un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios CHASE **Figura 12**, de tres modelos: AHK4 de *A. thaliana* y PcrK de *Xhantomonas campestris*, ambas cinasas histidínicas y CHASE de CdgD de *A. baldaniorum*, en donde se constata la baja identidad entre los dominios a nivel de secuencia de aminoácidos (15.45 %,

25.38%, con respecto a CdgD, respectivamente). Dicho alineamiento tuvo como propósito determinar si es que entre las secuencias contenían residuos de aminoácidos altamente conservados, en efecto se localizaron tres anotados con un recuadro rojo **Figura 12**. No obstante, determinándose que, de acuerdo a lo descrito (Chen et al., 2019; Hothorn et al., 2011; Savelieva et al., 2018; Wang et al., 2017; Wang & Qian, 2019), autores que refieren y de acuerdo a la secuencia secundaria descrita, que los aminoácidos que conforman la cavidad del dominio CHASE ubicada en la región PAS distal, son de naturaleza predominantemente hidrofóbica. En el alineamiento se encontraron efectivamente, motivos de naturaleza hidrofóbica conservados, **Figura 12**. Lo cual se verificó, con el análisis de acoplamiento molecular, interacciones proteína-ligando y análisis de cargas de la superficie proteica, que los aminoácidos que conforman la cavidad de dominio CHASE de CdgD son predominantemente hidrofóbicos, así mismo los aminoácidos que interactuarían con el ligando **Anexo 4** y **Anexo 5**.

Con el fin de contar con una estructura obtenida por homología del dominio CHASE de CdgD validada se utilizó la plataforma Swiss-Model para este fin, corroborándose en primera instancia, la estructura secundaria, mediante la comparación con la obtenida por Cruz-Perez *et al* (2021). Llevada a cabo con el uso de la plataforma I-Tasser **Figuras 13, 14** además la estructura se sometió a procesos de minimización validado mediante la plataforma MolProbity **Anexo1**, corroborando la estructura para continuar los estudios.

El estudio de acoplamiento molecular, lo iniciamos con prolina como ligando **Figura 15**, los datos obtenidos sugieren que, en efecto, el aminoácido se alojaría en la cavidad de la región PAS distal, sin embargo, lo hace con una  $\Delta G^\circ$  relativamente alta (-2.1 kcal/mol), que nos indica que la unión sería débil, entonces ¿esta unión generaría un cambio conformacional en la proteína? ¿o solo compite con la unión de un ligando que en efecto genere un cambio conformacional?, cabe destacar, que si bien (Zhulin et al., 2003), describen que el dominio CHASE reconocería citocininas y péptidos cortos, no incluyen a los aminoácidos. Ya que los dominios dCache\_1 (Mantilla *et al.*, 2021) y CHASE3 (Zhang et al., 2019), han sido descritos como la selección evolutiva favorecida de estos dominios para la unión específica de aminoácidos.

Por los datos obtenidos procedimos a revisar la unión con la tZ al dominio CHASE de CdgD. El resultado mostró la unión del ligando en el sitio PAS distal y, con  $\Delta G^\circ$  de  $-3.0$  kcal/mol

**Figura 16.** Esta molécula presenta una unión más favorecida con respecto a la prolina y concuerda con los datos de la proteína AHK4 de *A. thaliana*. Pues los autores reportan la obtención de un cristal del dominio CHASE de AHK4 co-cristalizado con tZ como ligando ello con una resolución de 19.82-1.53, un valor demasiado alto por lo que no es un cristal aceptable para la base de datos PDB, pero si establecería una unión de AHK4 con la tZ. Finalmente con el propósito de concretar este análisis procedimos a realizar el docking, con el ligando iP resultando el más importante y prometedor para su evaluación en la interacción con CdgD, y en efecto, lo obtenido indicó ser el ligando más favorecido termodinámicamente de los tres evaluados, con un  $\Delta G^\circ$  de -5.0 kcal/mol, lo que sugiere que iP podría ser el ligando específico de unión al PAS distal del dominio CHASE de CdgD **Figura 17**, constituyendo entonces la señal que propiciaría el cambio conformacional que habilite la generación de la interfase necesaria para una de las funciones catalíticas de la proteína. Como se muestra en el **Anexo 1** de este escrito, se llevó a cabo la validación de los estudios de acoplamiento molecular efectuados mediante un proceso que incluye el a menudo nombrado re-docking, con 3t4j como receptor e iP como ligando, obteniéndose un valor de  $\Delta G^\circ = -5.97$  Kcal/mol, valor que constituye el referente contra el que se deberán comparar los resultados obtenidos en los estudios de “Docking” efectuados en este trabajo.

Con el propósito de avanzar en los análisis *in silico* que en su caso apoyen la predicción descrita, procedimos a generar mutaciones sitio específicas tomando en consideración los datos obtenidos en *A. thaliana* respecto al estudio efectuado con la proteína AHK4 y los obtenidos con *X. campestris pv campestris* reportados por (Chen et al., 2019) respecto a la proteína PerK, y el estudio de acoplamiento molecular entre el dominio CHASE de la proteína CdgD e iP de este trabajo **Figura.18** y **tabla 5**, de la cual se desprenden las mutaciones en L<sup>142</sup>A y Y<sup>111</sup>A ya que, la realizada en R<sup>130</sup>A se generó a partir de los datos obtenidos mediante el alineamiento y el estudio de las interacciones ligando receptor.

La mutación de R<sup>130</sup>A del dominio CHASE de CdgD **Figura 19**, expuso un decremento significativo en el  $\Delta G^\circ$  (-5.05 Kcal/mol) respecto al estudio de acoplamiento efectuado con la CdgD nativa y la trans-zeatina ( $\Delta G^\circ$  de -3.0 Kcal/mol), lo que implicaría que la mutación R<sup>130</sup>A favorecería termodinámicamente la unión de trans-zeatina a CdgD. Es de interés mencionar que, en los 100 modelos de unión ligando-receptor evaluados por AutoDock4,

participa la **Ala130** en la interacción con la tZ, y la energía de cada unión individual aumentó con respecto a la de la silvestre.

La mutación **L<sup>142</sup>A** en la que se observa un incremento significativo en el  $\Delta G^\circ$  respecto al estudio de acoplamiento efectuado con la CdgD nativa e iP ( $\Delta G^\circ$  de -5.0 Kcal/mol), reveló una disminución significativa en la energía de la unión ( $\Delta G^\circ$  de -1.66 Kcal/mol), lo que implicaría que la mutación **L<sup>142</sup>A** disminuiría significativamente la afinidad ligando receptor **Figura 20**. En cuanto a la mutación **Y<sup>111</sup>A**, este cambio expuso un incremento significativo en el  $\Delta G^\circ$  respecto al estudio de acoplamiento efectuado con la CdgD silvestre e iP (-5.0 Kcal/mol), ello implicaría que la mutación **Y<sup>111</sup>A** abate prácticamente la unión receptor-ligando, ya que de 100 modelos de unión solo uno se llevó a cabo en la cavidad conocida (PAS distal) y lo hizo con un  $\Delta G^\circ$  positivo de 2.25 Kcal/mol.

Si bien hemos reunido información valiosa obtenida de los estudios de acoplamiento molecular efectuados, quedan aún una serie de cuestionamientos que no se circunscriben únicamente a la unión ligando receptor pues, si bien los antecedentes antes comentados reforzarían en cierta medida la hipótesis consistente en que el dominio CHASE de CdgD une citocininas y de manera puntual a la iP por tener un menor  $\Delta G^\circ$  de unión, sería de mucha relevancia entender el efecto de esta unión en la función de la proteína híbrida reguladora del di-GMPc y el papel del dominio sensor citoplasmático PAS contenido en el que, según lo predicho por la plataforma SMART es del tipo cuatro según lo reportado por (Matilla et al., 2021), el cual podría estar interactuando con Hidrocarburos aromáticos con diversas sustituciones, desempeñando entonces una doble función, captando una señal y participando en la formación de la interfase entre los dos monómeros, ya que se ha reportado que este desempeña una función en la interacción proteica que da lugar al homodimero funcional, y un ejemplo de esto lo aporta el estudio llevado a cabo para la caracterización de la DGC PA0847 de PAO1 (Zhang et al., 2019).

Si bien los tres ligandos evaluados *in silico* en este estudio se estarían uniendo al receptor en la cavidad de unión conocida, lo hicieron con distintas energías de unión siendo la iP, el ligando favorecido termodinámicamente, lo que nos conduce a las siguientes preguntas:

¿Los tres ligandos tendrían un impacto en la función de CdgD?

¿Si la iP es el ligando específico y la mutación R<sup>130</sup>A mejoro la energía de unión de la tZ, acaso esto implicara que el dominio CHASE con esta mutación pierda la especificidad por iP y adquiriera así la posibilidad de unirse a otra citocinina haciendo a la cepa más competitiva? Debemos recordar que las proteínas y los ligandos son sistemas dinámicos y por lo tanto lo es también la interacción entre ambos, por lo que, si bien un estudio de acoplamiento molecular nos aporta valiosa información sobre la forma de unión y la factibilidad termodinámica de ésta, no nos dice nada sobre la permanencia de esta unión en el tiempo requisito para que se suscite un cambio conformacional, que provoque un efecto en la función de CdgD.

## **12. Conclusiones.**

Los estudios realizados *in silico* sugieren que el dominio CHASE de CdgD participaría como receptor de la señal química que de acuerdo con lo estudiado pudiera ser la iP, sin embargo, será necesario efectuar mutaciones que generen cepas que puedan ser estudiadas fenotípicamente con el fin de complementar el conocimiento obtenido *in silico* y así generar datos que si fuese el caso, den respaldo a los ya obtenidos, por análisis bioinformáticos.

Si bien la iP se perfila como el ligando más probable de acuerdo con este estudio, y existen robustos estudios bioquímicos y fenotípicos realizados en ambos modelos *A. thaliana*, con la proteína AHK4, así como los estudios en *X. campestris* de HK PcrK que dan respaldo a la hipótesis propuesta por los autores de dichos estudios. En nuestro caso, es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* en *A. baldaniorum* Sp245 con la proteína CdgD para responder a las interrogantes antes planteadas.

## **13. Perspectivas.**

Será necesario analizar el efecto del pH en la función del dominio CHASE de CdgD, y si distintos ligandos estuviesen compitiendo entre sí por el sitio de unión, tal como el impacto de la interacción en la función de los dominios de DGC y/o PDE de CdgD. Y para ello se propone lo siguiente: Llevar a cabo una mutación por remoción del dominio CHASE de CdgD y evaluar las funciones de movilidad y formación de biopelícula. Generar las mutaciones sitio específicas correspondientes para corroborar lo observado *in silico* en relación con la unión con el ligando realizando ensayos fenotípicos de dichas cepas que establezcan el impacto de estas mutaciones, esto en presencia de los distintos ligandos evaluados en este estudio y mezclas de ellos y de tal manera establecer la interacción y

función de estos en CdgD. Hacer estudios fenotípicos con las cepas mutantes de movilidad y/o formación de biopelícula a distintos valores de pH.

#### 14. Bibliografía.

1. Aoki, M. M., Emery, R. J. N., Anjard, C., Brunetti, C. R., & Huber, R. J. (2020). Cytokinins in *Dictyostelia* – A Unique Model for Studying the Functions of Signaling Agents From Species to Kingdoms . In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8, p. 511). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00511>
2. Ballón & Grados (2019). Molecular docking: practical criteria for selection of biologically active ligands and identification of new therapeutic targets. *Rev.Cs.Farm. y Bioq* vol.7 no.2 La Paz.
3. Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins.
4. Cáceres, E. A. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 990–991. <https://doi.org/10.1128/aem.44.4.990-991.1982>
5. Cassan, F., Okon, Y., & Creus, C. (2015). Handbook for *Azospirillum*: Technical Issues and Protocols. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7>
6. Chen, P., Jiao, X., Zhang, Y., Wu, L., Tang, D.-J., Li, P., Chen, X., Chao, D., Tang, J.-L., & Ming, Z. (2019). The crystal structure of the phytopathogenic bacterial sensor PcrK reveals different cytokinin recognition mechanism from the plant sensor AHK4. *Journal of Structural Biology*, 208(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.08.001>
7. Cruz-Pérez, J. F., Lara-Oueilhe, R., Marcos-Jiménez, C., Cuatlayotl-Olarte, R., Xiqui-Vázquez, M. L., Reyes-Carmona, S. R., Baca, B. E., & Ramírez-Mata, A. (2021). Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80125-3>
8. Dahlstrom, K. M., & O'Toole, G. A. (2017). A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annual Review of Microbiology*, 71, 179–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093325>
9. David, M.-M., Álvaro, O., A., M. M., Sergio, M.-R., A., G. J., Tino, K., & T., L. M. (2021). The Molecular Mechanism of Nitrate Chemotaxis via Direct Ligand Binding to the PilJ Domain of McpN. *MBio*, 10(1), e02334-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02334-18>
10. Dayton, H., Smiley, M. K., Forouhar, F., Harrison, J. J., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E. P. (2020). Sensory Domains That Control Cyclic di-GMP-Modulating Proteins: A Critical Frontier in Bacterial Signal Transduction. In S.-H. Chou, N. Guiliani, V. T. Lee, & U. Römling (Eds.), *Microbial Cyclic Di-Nucleotide Signaling* (pp. 137–158). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33308-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33308-9_9)
11. de la Fuente Cantó, C., Simonin, M., King, E., Moulin, L., Bennett, M. J., Castrillo, G., & Laplace, L. (2020). An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 103(3), 951–964. <https://doi.org/10.1111/tpj.14781>

12. de-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., Nelson, K. N., Bashan, Y., & Maier, R. M. (2010). Growth of quailbush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. *Microbial Ecology*, 60(4), 915–927. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9713-7>
13. dos Santos Ferreira, N., Hayashi Sant' Anna, F., Massena Reis, V., Ambrosini, A., Gazolla Volpiano, C., Rothballer, M., Schwab, S., Baura, V. A., Balsanelli, E., Pedrosa, F. de O., Pereira Passaglia, L. M., Maltempi de Souza, E., Hartmann, A., Cassan, F., & Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
14. Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>
15. Galperin, M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology*, 6(6), 552–567. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00633.x>
16. Gamboa Pérez Adriana(2015) Tesis de maestría.
17. Gupta, A., Gopal, M., & Tilak, K. V. (2000). Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian journal of experimental biology*, 38(9), 856–862.
18. Granchi, C., Capecchi, A., del Frate, G., Martinelli, A., Macchia, M., Minutolo, F., & Tuccinardi, T. (2015). Development and validation of a docking-based virtual screening platform for the identification of new lactate dehydrogenase inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), 8772–8790. <https://doi.org/10.3390/molecules20058772>
19. Guerrero-Molina, M. F., Winik, B. C., & Pedraza, R. O. (2012). More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. *Applied Soil Ecology*, 61, 205–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.011>
20. Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, 65, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631>
21. Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444–460. <https://doi.org/10.1021/ci800293n>
22. Hothorn, M., Dabi, T., & Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature Chemical Biology*, 7(11), 766–768. <https://doi.org/10.1038/nchembio.667>
23. Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 385–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090423>
24. Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(5), 271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>

25. Jordán & Casaretto Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile (2006) 15: xx-xx
26. Kabbara, S., Bidon, B., Kilani, J., Osman, M., Hamze, M., Stock, A. M., & Papon, N. (2020). Cytokinin Sensing in Bacteria. *Biomolecules*, 10(2), 186. <https://doi.org/10.3390/biom10020186>
27. Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O., & Dodd, I. C. (2019). Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses . In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10, p. 1368). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01368>
28. Klee, H., & Estelle, M. (1991). Molecular Genetic Approaches to Plant Hormone Biology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 529–551. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.002525>
29. Lara Oueilhe, Roxana (2018) ESTUDIO FENOTÍPICO DEL LOCUS AZOBR\_100210 de *Azospirillum brasilense* (Maestría). Instituto de Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
30. Mata, A. R., Pacheco, C. M., Cruz Pérez, J. F., Sáenz, M. M., & Baca, B. E. (2018). In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>
31. Matilla, M. A., Velando, F., Martín-Mora, D., Monteagudo-Cascales, E., & Krell, T. (2021). A catalogue of signal molecules that interact with sensor kinases, chemoreceptors and transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab043>
32. McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2011). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
33. O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
34. Pas, J., von Grotthuss, M., Wyrwicz, L. S., Rychlewski, L., & Barciszewski, J. (2004). Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Letters*, 576(3), 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.020>
35. Pedraza, R. O., Filippone, M. P., Fontana, C., Salazar, S. M., Ramírez-Mata, A., Sierra-Cacho, D., & Baca, B. E. (2020). Chapter 6 - *Azospirillum* (N. Amaran, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. B. T.-B. M. in A.-E. Sankaranarayanan, Eds.; pp. 73–105). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X>
36. Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L., & Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 242–255. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)
37. Ren, X., Ren, S., Xu, G., Dou, W., Chou, S.-H., Chen, Y., & Qian, G. (2020). Knockout of Diguanylate Cyclase Genes in *Lysobacter enzymogenes* to Improve

- Production of Antifungal Factor and Increase Its Application in Seed Coating. *Current Microbiology*, 77(6), 1006–1015. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01902-x>
38. Rodrigues, A. C., Bonifacio, A., de Araujo, F. F., Junior, M. A. L., & do Vale Barreto Figueiredo, M. (2015). *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem* (pp. 29–51). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_2)
  39. Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 77(1), 1–52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>
  40. Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
  41. Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol. Annual Review of Plant Biology*, 57, 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
  42. Samanovic, M. I., Hsu, H. C., Jones, M. B., Jones, V., McNeil, M. R., Becker, S. H., Jordan, A. T., Strnad, M., Xu, C., Jackson, M., Li, H., & Darwin, K. H. (2018). Cytokinin signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00989-18>
  43. Savelieva, E. M., Oslovsky, V. E., Karlov, D. S., Kurochkin, N. N., Getman, I. A., Lomin, S. N., Sidorov, G. V., Mikhailov, S. N., Osolodkin, D. I., & Romanov, G. A. (2018). Cytokinin activity of N6-benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors in planta, in vitro, and in silico. *Phytochemistry*, 149, 161–177. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.008>
  44. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  45. Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? In B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, & T. N. Sieber (Eds.), *Microbial Root Endophytes* (pp. 1–13). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_1)
  46. Simm, R., Morr, M., Remminghorst, U., Andersson, M., & Römling, U. (2009). Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 386(1), 53–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.12.013>
  47. Steenhoudt, O., & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>
  48. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
  49. Wang, F.-F., Cheng, S.-T., Wu, Y., Ren, B.-Z., & Qian, W. (2017). A Bacterial Receptor PcrK Senses the Plant Hormone Cytokinin to Promote Adaptation to

- Oxidative Stress. *Cell Reports*, 21(10), 2940–2951.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.017>
50. Wang, F.-F., & Qian, W. (2019). The roles of histidine kinases in sensing host plant and cell-cell communication signal in a phytopathogenic bacterium. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1767).  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0311>
51. Whiteley, C. G., & Lee, D.-J. (2015). Bacterial diguanylate cyclases: Structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development. *Biotechnology Advances*, 33(1), 124–141. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.010>
52. Zhang, Y., Guo, J., Zhang, N., Yuan, W., Lin, Z., & Huang, W. (2019). Characterization and analysis of a novel diguanylate cyclase PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and Drug Resistance*, 12, 655–665.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S194462>
53. Zhulin, I. B., Nikolskaya, A. N., & Galperin, M. Y. (2003). Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 285–294.  
<https://doi.org/10.1128/JB.185.1.285-294.2003>

## 15. Anexos

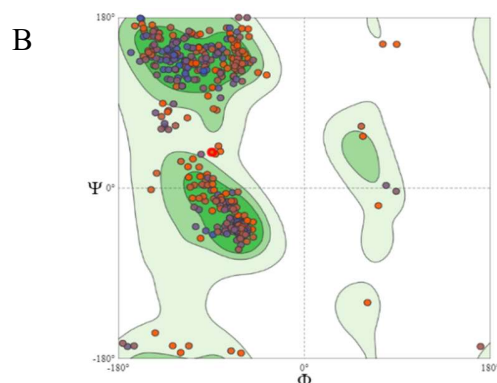
### Anexo 1

#### Validación del modelo obtenido con Swis-Model con 6k62 como molde, mediante la plataforma Mol-Probity.

Es indispensable en los estudios que utilizan la biología estructural como herramienta el validar las estructuras que se emplean para los posteriores estudios bioinformáticos como lo son los acoplamientos moleculares. Para ello existen plataformas como Mol-Probity la cual realiza una validación exhaustiva del modelo sometido y continuación se muestran los parámetros más relevantes obtenidos en dicha validación. Cabe señalar que un proceso de minimización de las cargas de los enlaces de la estructura puede mejorar los valores de la validación, por lo que, para este estudio, en virtud de los resultados obtenidos en primera instancia se realizó este proceso lográndose una mejora como se muestra a continuación.

A

<b>Residuos favorecidos por Ramachandran.</b>		GMQE: 0.67 (0 a 1) QMEAN: -3.50 (< -4.0) Identidad de las secuencias: 25.10% Cobertura: 97.0%
Antes de la minimización	Después de la minimización	
88.24%	89.67%	



**Figura 1.**

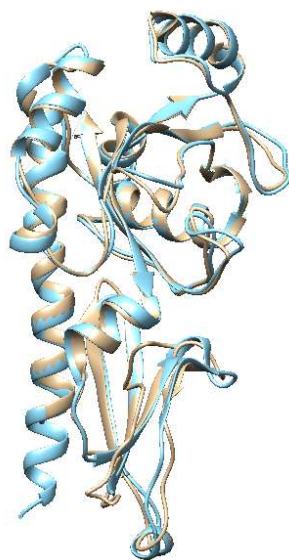
**Validación del modelo por Mol-Provity.**

En A) se muestran los valores arrojados por Mol-Provity. En la imagen B), se muestra el grafico de Ramachandran que establece la idoneidad de los ángulos Phi y Psi que se establecen entre el átomo de carbono  $\alpha$  y el carbono  $\beta$  (carboxilo) y el átomo de nitrógeno, es decir, los átomos de carbono y nitrógeno que componen el grupo amino de cada aminoácido que componen el dominio en estudio.

**Anexo 2**

**Estudio de empalme de estructuras con el software Chimera.**

Este estudio a diferencia del realizado con el software PymMol el cual nos aporta un valor de r.m.s.d, muestra el grado de identidad entre las dos estructuras, pero mediante una relación porcentual en la identidad.



**Figura1.**

**Alineamiento estructural.**

En la imagen se puede ver la estructura del dominio CHASE de *X.campestris* sp 6K62 en azul y la estructura del mencionado dominio de *A.baldaniorum* sp 245 CdgD.

El valor determinado en cuanto a la identidad entre las dos estructuras mediante el software Chimera es de 23.11%

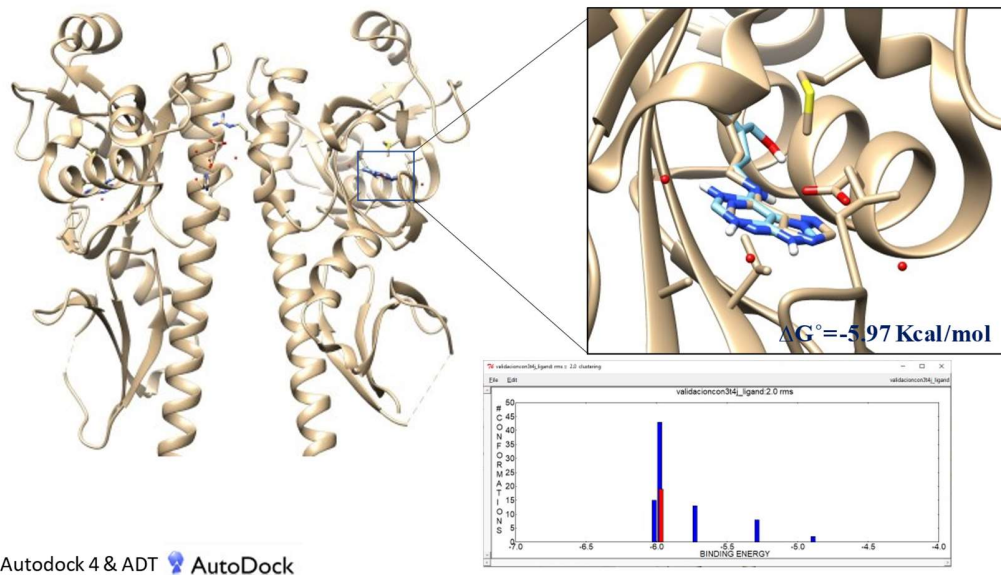
### Anexo 3.

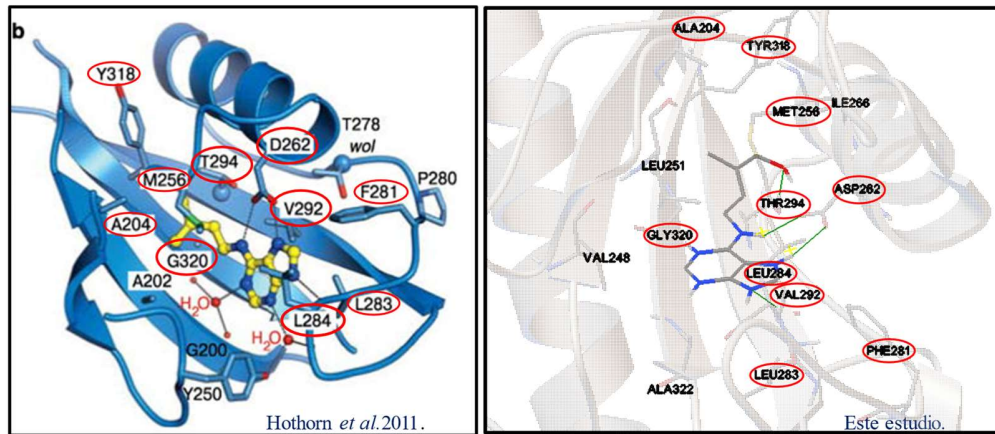
#### Validación de los estudios de acoplamiento molecular.

La validación de los estudios de acoplamiento molecular proporciona robustez a los resultados obtenidos, pues aporta evidencia de la reproducibilidad de estos resultados, así como de la idoneidad del sistema (software, estructura del cristal, ligando, procesamiento de preparación del receptor y del ligando).

Esta validación se llevó a cabo según lo reportado por (Hevener et al., 2009; Paucara *et al* 2019). El proceso de validación llevado a cabo para este estudio consiste en la ejecución de un estudio de acoplamiento molecular utilizando a la iP co-cristalizada con 3t4j como ligando y la estructura cristalizada del dominio CHASE de *A.thaliana* como receptor, lo que es en ocasiones nombrado como un “re-docking”, ello con el fin de analizar el modo de unión y el sitio de unión comparándolo con la estructura co-cristalizada, también se comparan las interacciones del ligando con aminoácidos específicos y estas deben conservarse. Cuando el modo de unión y el sitio de unión son casi idénticos tanto en el re-docking como en la estructura co-cristalizada y se conservan las interacciones. En la Figura 24 se pueden observar los supuestos antes mencionados.

a)





**Figura 1.**

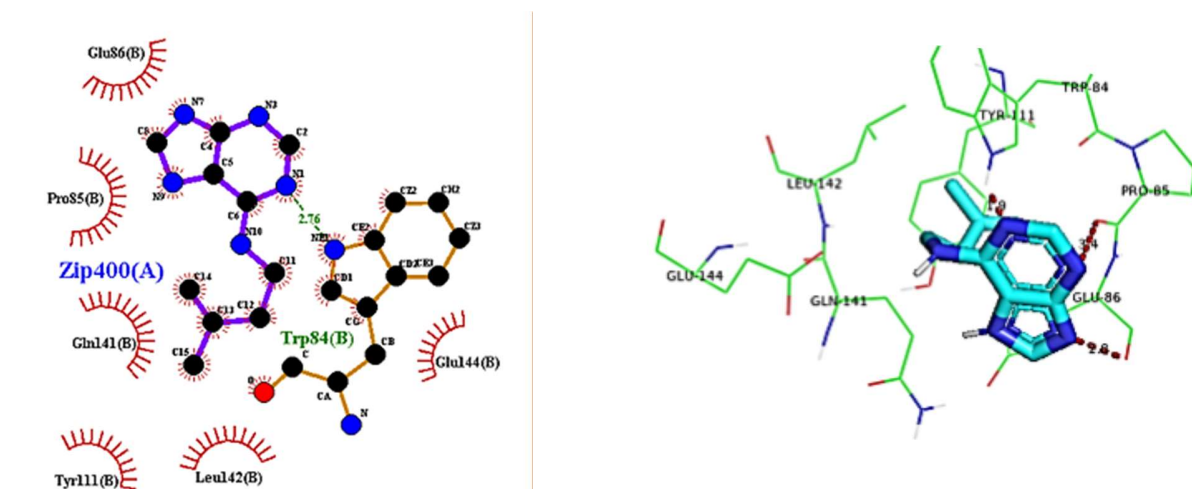
**Validación del “Docking”.**

En a) se muestra a la isopentil adenina (iP), acoplada al sitio de unión en la región PAS distal del dominio CHASE de la proteína AHK4 de *A. thaliana*, cristal depositado en la base de datos PDB como 3t4j co-cristalizado con iP como ligando. El acoplamiento se realizó mediante Autodock 4 como metodología de validación de los estudios de acoplamiento molecular. Se indica en azul la iP como ligando y en dorado a la iP co-cristalizada. En b) se muestran las interacciones conservadas resaltadas en color rojo. El gráfico de barras corresponde a las frecuencias de unión en Y y los  $\Delta G$  en X (en rojo el “cluster” en donde se encuentra el modo de unión mostrado en la figura).

**Anexo 4**

**Análisis de las interacciones no covalentes entre la iP y la cavidad del dominio CHASE de la proteína Cdgd.**

Este estudio tiene como finalidad hacer la predicción de la naturaleza de las interacciones ligando – receptor, de los aminoácidos que participarían en la unión, la importancia del análisis consiste en la información que aporta en cuanto a la estabilidad de la virtual unión, además estos datos pueden ser comparados contra los modelos que han servido como referencias para este estudio (AHK4 y PcrK) Pues al ser dominios CHASE estudiados en lo respectivo a su interacción con las hormonas llamadas citocininas la naturaleza de las interacciones parecen estar conservadas. Siendo la iP el ligando más favorecido termodinámicamente y por ello el más probable, solo se efectuó este análisis con este ligando.



**Figura 1.****Interacciones ligando receptor.**

Se muestra a la isopentil adenina (iP), acoplada al sitio de unión en la región conocida como PAS distal del dominio CHASE de DdgD, se indican los siete aminoácidos que interactúan con la iP. Una es un puente de hidrogeno y seis restantes son de naturaleza hidrofóbica. A la izquierda se muestra el estudio realizado con el software LIGPLOT y a la derecha un estudio de interacciones usando PyMol, cabe señalar que el segundo software no está habilitado para predecir interacciones hidrofóbicas.

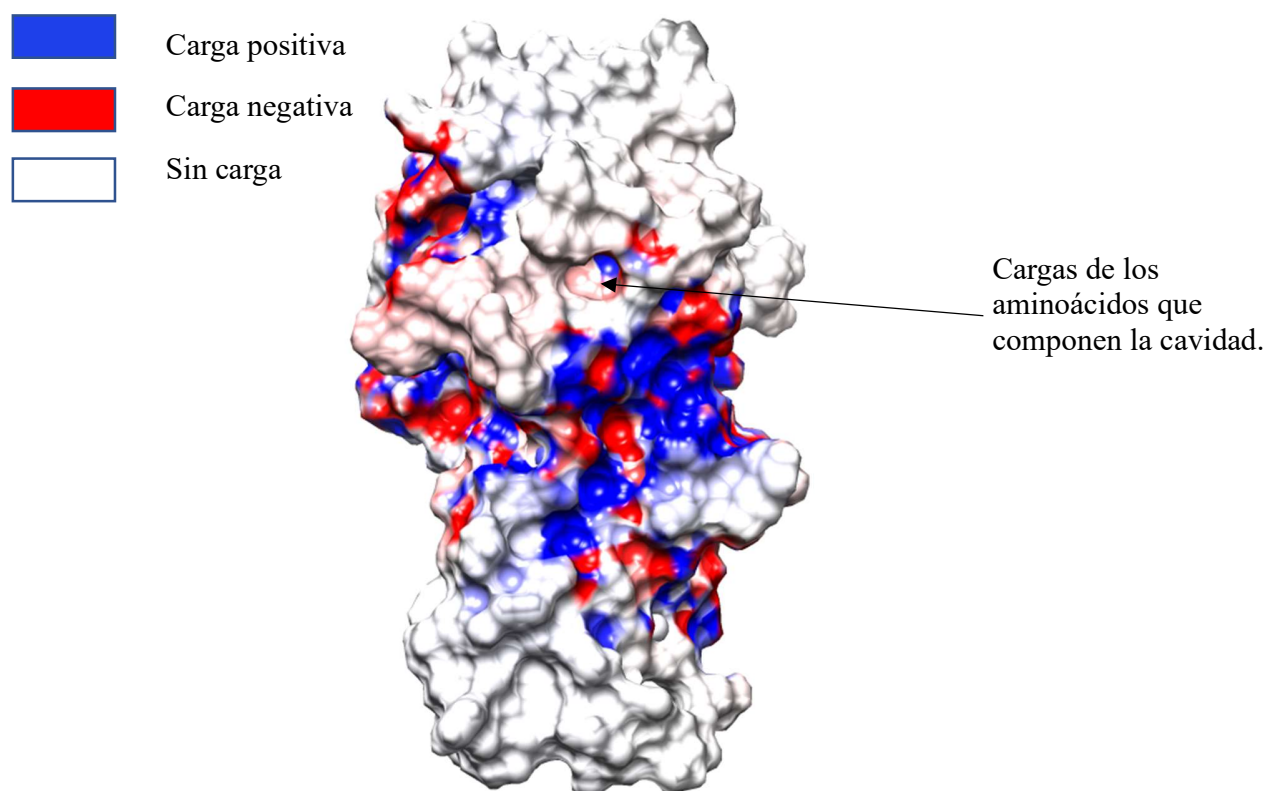
**Tabla 1.****Resumen de los análisis de las interacciones.**

\*En la tabla se muestran los aminoácidos que interactuarían directamente con la iP, así como la naturaleza de estas virtuales interacciones.

Residuo	Naturaleza de la interacción
TRP 84	<b>Puente de Hidrogeno</b>
PRO 85	<b>Hidrofóbica</b>
GLU 86	<b>Hidrofóbica</b>
TYR 111	<b>Hidrofóbica</b>
GLN 141	<b>Hidrofóbica</b>
LEU 142	<b>Hidrofóbica</b>
GLU 144	<b>Hidrofóbica</b>

**Anexo 5****Análisis de la distribución de cargas del dominio CHASE de la proteína CdgD.**

Este análisis tiene como objetivo corroborar la distribución de cargas específicamente respecto a los aminoácidos que componen la cavidad conocida, ubicada en la región PAS distal del dominio.



**Figura 1.**

**Análisis de cargas en la superficie del dominio CHASE de CdgD.**

En la imagen se pueden apreciar la distribución de cargas de la región periplasmática de CdgD, este estudio se realizó utilizando los algoritmos de PDB2PQR y APBS y se visualizó en Chimera. Señalados con una flecha se encuentran los aminoácidos de la cavidad apreciándose que son predominantemente sin carga (hidrofóbicos).

**Anexo 6**

**Condiciones de cultivo y cepas bacterianas.**

Se utilizaron 2 cepas de *Azospirillum*: la cepa silvestre de *A. baldaniorum* Sp245, la cepa mutante D-12A de *A. baldaniorum* Sp245. Las cepas fueron sembradas en medio mínimo K-Malato e incubadas durante 18 h a 30 °C con agitación a 150 rpm. Transcurridas las 18 horas, se observó su morfología al microscopio, células de forma vibroide y móviles, posteriormente se resembraron en medio líquido Luria-Bertani Modificado (LB\*, 10 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM CaCl<sub>2</sub>) incubadas también a 30 °C, 150 rpm durante 18 h y en placas con medio Rojo Congo (RC), éstas se incubaron a 30 °C, observando después de 48 h de incubación, colonias de color rojo escarlata. Las cepas se sembraron en los medios con el antibiótico de selección. Mutante D-12A: Kanamicina (Km), 50 µg/ml, C-56A: Km 50 µg/ml y Tetraciclina (Tc) 15 µg/ml, C-40A: Km, 50 µg/ml y Tc a 15µg/ml.

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio líquido Luria-Bertani y fueron incubadas a 37 °C a 150 rpm por 18 h.

**Tabla 1.**  
**Cepas bacterianas.**

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG <math>\Phi</math>80dlacZAM15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>recA thi pro hdsR4 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) (RP4-2T::M-Km::Tn7) T<sub>p</sub><sup>r</sup> Sm<sup>r</sup> <math>\lambda</math>pir</i>	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>A. balaniorum</i> sp245	Cepa silvestre aislada de la superficie estéril de las raíces de trigo, (Brasil)	Baldani <i>et al.</i> 1986
<i>A. brasilense</i> 12-A	Mutante <i>cdgD</i> ::Km <sup>R</sup> de <i>A. brasilense</i> Sp245	Gamboa-Pérez, 2014

**Tabla 2.**  
**Vectores y plásmidos empleados en este trabajo.**

Plásmido o vector	Descripción	Referencia
pBBR1MCS- 5	Promotor: Lac/lac, T3, T7, Ori: pBBR1GmR Hospedero: Amplio rango	Kovach ME, et al. 1994, Kovach et al. 1995,
pBBcdgD5'	Contiene el gen <i>cdgD</i> en dirección 5'-3', entre los sitios de restricción: (R) <i>Xho</i> I y (H) <i>Hind</i> III Gm <sup>R</sup> . De amplio rango de hospedero.	Ramirez Mata 2019

## Técnicas de biología molecular

### Extracción de DNA genómico

Se sembraron 5 ml de medio LB\* con 1 o 2 colonias de un cultivo en RC y se incubaron 18h a 30 °C y 150 rpm. En tubo eppendorff, se centrifugaron de 3 a 5 ml del cultivo a 10,000 rpm por 3 min; se decantó el medio restante y se obtuvo el paquete celular, el cual se resuspendió con 500  $\mu$ l de buffer TE, 30  $\mu$ l de SDS 20% y 3  $\mu$ l de pronasa E (10 mg/ml) y se incubó 1 h a 37 °C. Se agregó 100  $\mu$ l de NaCl 3M y 80  $\mu$ l de una solución alcalina de CTAB al 10 % y se incubó a 65°C, 10 min. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm. Se transfirió la fase superior a otro tubo y se repitió lo anterior, agregando 500  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)

y centrifugando 5 min a 12,000 rpm. Se volvió a transferir la fase superior a otro tubo eppendorf y se lavó nuevamente con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Una vez limpio en DNA, se agregaron 1.5 volúmenes de Etanol 100 %, y se incubó a -80 °C por 15 min. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min y se eliminó el sobrenadante por decantación, cuidando no perder el DNA. Obtenido el DNA al fondo, se lavó con 800 µl de etanol al 70 % centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min, 2 veces, se eliminó el etanol y se evaporó al colocar el tupo eppendorf con la tapa abierta, en un termoblock a 37 °C por 5-10 min. Quedando únicamente el DNA al fondo del tubo, se resuspendió en 30 µl de RNAsa (100 µg/ml) y se incubó a 37 °C por 30 min. Finalmente se realizó una electroforesis con 3-5 µl de muestra de DNA para corroborar la correcta extracción genómica y el resto de la muestra se almacenó a -20 °C. (Sambrook & Russell, 2001).

#### **Extracción de DNA plasmídico**

Con 1 o 2 colonias tomadas de un cultivo en RC, se inocularon 5 ml de medio LB\* y se incubó por 18h a 30 °C con agitación constante (150 rpm). Se tomó de 3 a 5 ml y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min; se decantó el sobrenadante y se obtuvo el paquete celular el cual se resuspendió en 300 µl de solución de lisis alcalina I y se agregó 400 µl de solución de lisis alcalina II, se mezcló bien y se colocó el tubo a -20 °C 10 min. Se agregaron 300 µl de solución alcalina III fría, se mezcló y mantuvo a -20 °C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclando bien y centrifugando por 5 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se colocó en otro tubo eppendorf y se agregó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), 400 µl, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min; se repitió hasta que la interfase mostró el DNA limpio. Posteriormente se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf y se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien la solución y se dejó precipitar por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min y se recuperó el DNA. Se eliminó el sobrenadante y el DNA que permanece al fondo del tubo, se lavó, agregando 800 µl etanol al 70% y centrifugando 5 min a 10,000 rpm. Este paso se repitió una vez más. Se eliminó por decantación del etanol y el restante se evaporó al colocar el tubo con la tapa abierta, en un termoblock a 37 °C de 5 a 10 min. El DNA en el tubo se resuspendió en 30 µl de RNAsa (100 µg/ml) y se incubó 30 minutos a 37 °C. Finalmente se realizó la electroforesis

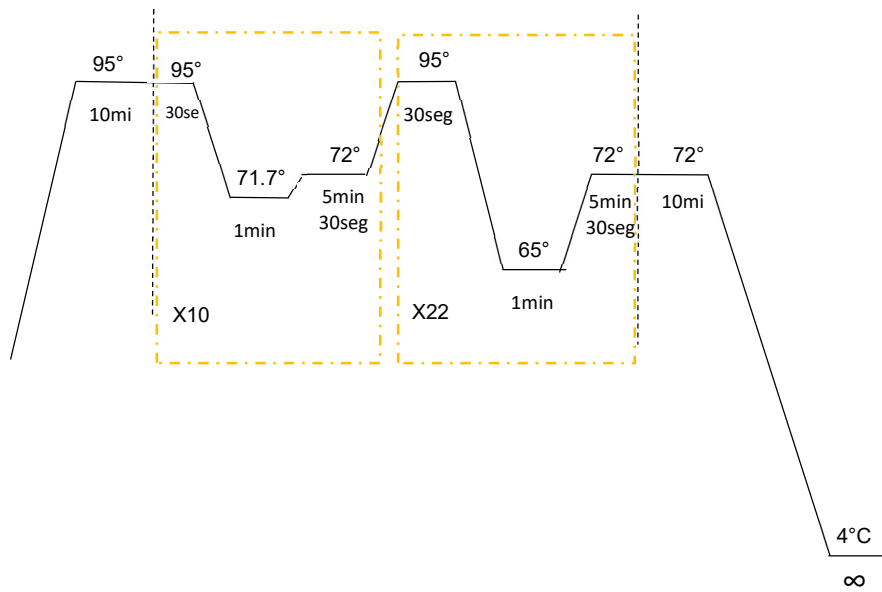
con 3-5 µl de muestra de DNA plasmídico, para comprobar la correcta extracción y el resto de muestra se almacenó a -20 °C (Sambrook & Russell, 2001).

**Tabla 1.**  
**Iniciadores usados en este trabajo.**

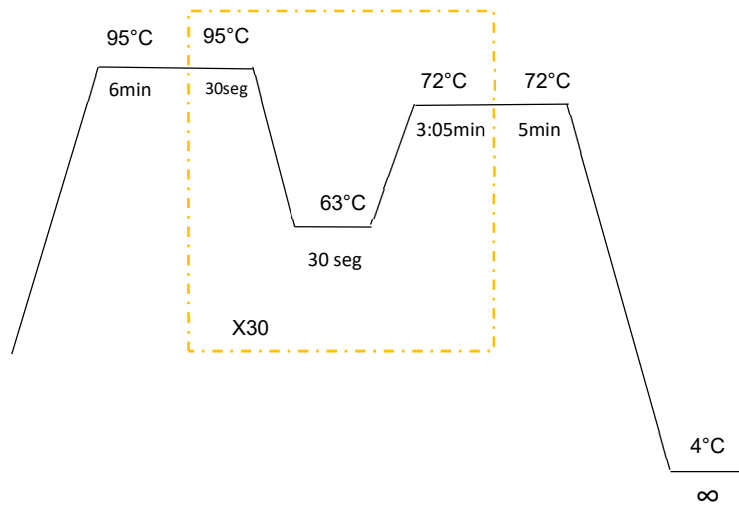
Iniciador	Secuencia 5'-3'	Referencia
Mutación del gen <i>cdgD</i>		
4571RC	GTGGCGGGGCGATGGGGAAGG	Gamboa-Pérez, 2014.
4571DC	GCGGCTGGGTGCGGGACAAC	
Gen <i>cdgD</i> con promotor		
F-ORF210	AGAAAGCTTAGATCCTGGGCATGATCG AG	Lara <i>et al.</i> 2018.
R-ORF210	AGCCTCGAGAGAAGGCGTGGTGACCTT TC	
Fragmento A		
FEdeIChase	TTTTCGGAAACGCTGAACGCCT	Este trabajo.
FIdeIChase	AAGCTTGATGCTGATGGAAGCGGGCA	
Fragmento B		
RdeIChase	TCGCGAGACGGAAGTAGCAGGGGAAG ACGTTTCGGA	Este trabajo.
FdeIChase	ACGTCTTCCCCTGCTTCGCGAGACGGA ACTGGATCT	
Fragmento AB		
REdeIChase	ACCATCGGCCACAACGCGAA	Este trabajo.
RIdeIChase	CTCGAGAAGAAGGCGTGGTGACCTT	

### **Amplificación del gen *cdgD* por PCR.**

Se llevó a cabo la amplificación del gen *cdgD* usando los iniciadores 4571 DC y 4571 RC para la comprobación de las clonas bajo las condiciones siguientes: DNA 2 ng, dNTP's 4 mM, DMSO 1.5X, iniciador delantero 0.5 µM, iniciador reverso 0.5 µM, *Taq*Pol 0.5 U, Buffer 2.5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, H<sub>2</sub>O 7.3 µl correspondiente a 2X. Los gráficos de T (°C) vs tiempo (t) se muestran en el **Anexo 7** y las condiciones para la obtención del gen *cdgD* con el promotor nativo por PCR se muestran en el **Anexo 8**.



**Figura 1.**  
**Programa de PCR empleado para la obtención del amplificado del gen *cdgD* con los iniciadores 4571 DC y 4571 RC**  
 (Gamboa-Pérez, 2014).



**Figura 2.**  
**Condiciones de PCR empleadas para la obtención del amplificado del gen *cdgD* con su promotor, empleando los iniciadores F-ORF210 y R-ORF210.**

## Anexo 7

### Mapa genético del gen *cdgD* de *A. baldaniorum* Sp245 que indica la localización de los iniciadores y las regiones que amplifican.

Con la finalidad de llevar a cabo técnicas de genética y biología molecular para obtener una mutante por delección de la región citoplasmática de CdgD y determinar el impacto de esta en el fenotipo en cuanto a movilidad y formación de biopelícula, se diseñaron un total de 6 iniciadores específicos. En la **Fig.1** se esquematiza tanto el mapa genético del dominio de *cdgD*, como los sitios de hibridación de los iniciadores.

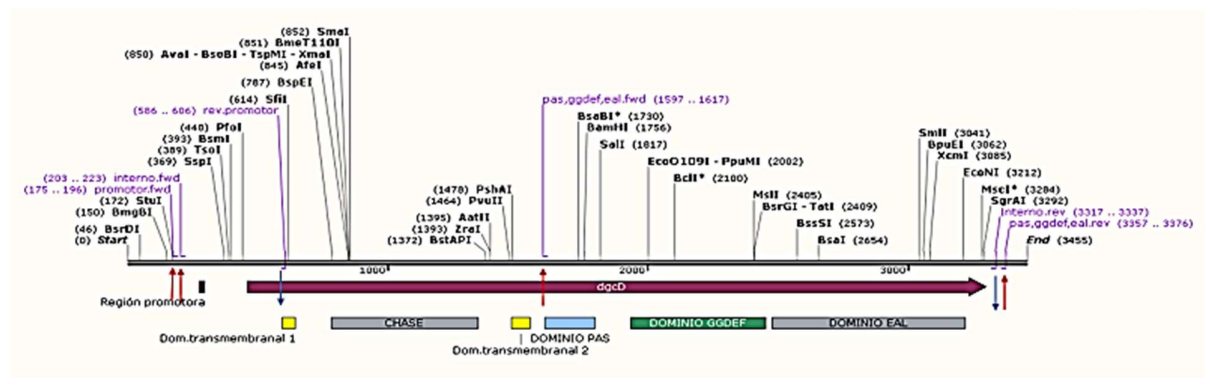


Figura 1.

### Mapa genético y ubicación de los iniciadores en la secuencia de nucleótidos.

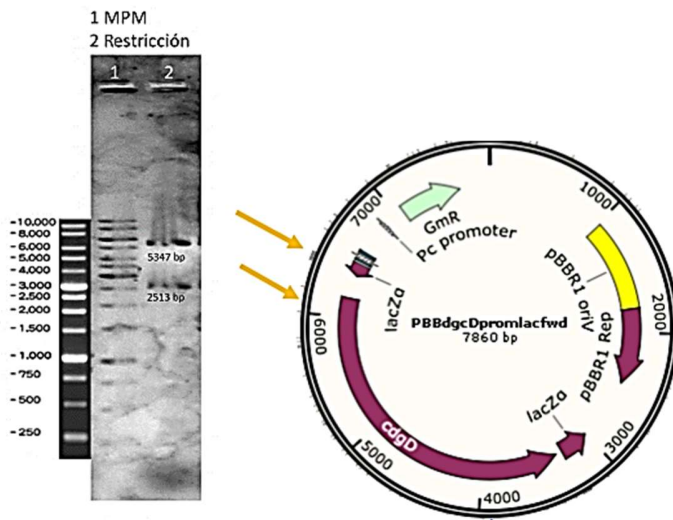
Las flechas rojas indican la localización de los iniciadores “Forward” y las flechas azules indican la posición de los iniciadores “Reverse”.

## Anexo 8

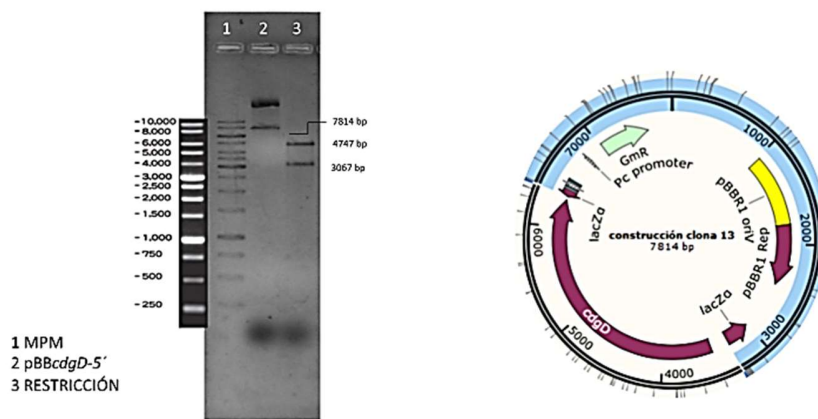
### Resultados experimentales.

#### Determinación de la dirección del gen *cdgD* en las clonas 8 y 12.

Se llevaron a cabo restricciones con las enzimas *SmaI*, *XhoI* y *HindIII*, en donde la restricción mediante *SmaI* liberaría el gen *cdgD* en el caso de la Clona 8 y en el caso de la clona 12 esto se da mediante la restricción con las enzimas *XhoI* y *HindIII*.



**Figura 1**  
 Electrofoetograma de la restricción con la enzima *SmaI* que determina la dirección 5'-3' del gen *cdgD* en la clona 8.



**Figura 2.**  
 Electrofoetograma de la restricción con las enzimas *XhoI* y *HindIII* que determina la dirección 5'-3' del gen *cdgD*.