



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGIA

BUAP

**MUTACIÓN Y COMPLEMENTACIÓN DEL GEN *cdgF* DE
Azospirillum brasilense Sp245 QUE CODIFICA PARA UNA
PROTEÍNA CON PRESUNTAS FUNCIONES DE DIGUANILATO
CICLASA Y FOSFODIESTERASA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

Q.F.B. JESÚS URIEL ESPINO ALDABA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ALBERTO RAMÍREZ MATA

PUEBLA, PUEBLA.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por haberme permitido culminar mis estudios de maestría y haberme dado la fortaleza para salir adelante.

A mi madre, por el gran amor que tienes hacia mí, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien, y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla... no hay palabras en este mundo para agradecerte, mamá.

A mi tía Gloria y mi tío Jacinto, por sus palabras de aliento, motivación y sus buenos deseos. Por todo el apoyo que me brindaron en el transcurso de mi vida.

A mi asesor de tesis el Dr. Alberto Ramírez Baca, por la orientación, ayuda y comprensión que me brindó para la realización de esta tesis, por su paciencia y por la motivación que me daba para poder avanzar en mi tesis.

A la Dra. Baca por su paciencia y apoyo, y su dedicación que me brindo para la terminación de mi tesis.

A la Dra. Sandra por darme siempre ánimos, su apoyo y consejos, motivándome para mi proyecto.

A la Química María Luisa, que siempre estaba al pendiente de mis avances y por su ayuda en el laboratorio que me permitieron avanzar más rápido.

A todos mis amigos y compañeros de la universidad por su apoyo y las buenas experiencias que vivimos juntos.

Por aquellas personas que, aunque no están físicamente aquí en este mundo, aun las recuerdo con mucho amor y cariño y sé que siempre estuvieron conmigo apoyándome, dándome la fuerza para seguir adelante, siempre las llevaré en mi corazón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le agradezco la beca recibida durante la maestría.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.”

INDICE

1.	RESUMEN	7
2.	INTRODUCCIÓN	8
2.1	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	8
2.2	El género <i>Azospirillum</i>	9
2.3	Quimiotaxis	10
2.4	Colonización de <i>Azospirillum</i> a la planta	12
2.5	Formación de biopelícula	12
2.6	Transición de estilo de vida: móvil a sésil	13
2.7	Di-GMP-c (Diguanilato monofosfato cíclico)	14
2.8	Síntesis del di-GMP-c	15
2.9	Hidrolisis del di-GMP-c	16
2.10	Proteínas híbridas con dominios DGCs y PDEs	16
2.11	DGCs y PDEs asociadas a dominios de señalización	17
2.12	Receptores del di-GMP-c	18
3.	ANTECEDENTES DIRECTOS	22
4.	HIPOTESIS	25
5.	JUSTIFICACION DEL TRABAJO	25
6.	OBJETIVO GENERAL	26
7.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
8.	ESQUEMA DE TRABAJO	27
9	MATERIALES Y MÉTODOS	28
9.1.	Análisis bioinformático	28
9.2	Cepas bacterianas utilizadas	28
9.3	Plásmidos utilizados	29
9.4	Iniciadores utilizados	30
9.5	Condiciones de crecimiento	31
9.6	Construcción de pGEM-FA y pGEM-FB	31
9.7	Construcción del vector suicida pJMS-FAB	32
9.9	Construcción del plásmido integrativo pAZBR-Gm	34
10.	RESULTADOS	36

10.1 ANALISIS BIOINFORMÁTICOS	36
10.1.2. Modelado de los dominios CACHE de la proteína CdgF.....	37
10.1.3. Modelado de los dominios PAS.....	42
10.1.4. Modelado de los dominios DGC y PDE.....	44
11. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	48
11.1. Obtención del plásmido mutagénico pJMS-FAB40391	48
11.5. Obtención de la mutante $\Delta cdgF$	53
11.6. Obtención del plásmido integrativo pAZBR- <i>cdgF</i>	54
11.7. Obtención de la cepa complementada.	60
12. DISCUSION DE RESULTADOS	63
13. CONCLUSIONES.	67
14. PERSPECTIVAS.	67
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de genes codificantes para proteínas con dominios GGDEF, EAL y proteínas híbridas en el genoma de cepas de <i>Azospirillum</i>	22
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.	28
Tabla 3. Vectores utilizados en este estudio.	29
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizadas en este estudio.	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos bioquímicos por los cuales las rizobacterias median la promoción del crecimiento y salud de la planta..	9
Figura 2. Formación de biopelícula.	13
Figura 3. Estructura y funciones fisiológicas del di-GMP-c	15
Figura 4. Diversidad de factores de unión del di-GMP-c (Tomado y modificado de Hengge, 2016).	19
Figura 5. Contexto genético y proteico del gen <i>cdgF</i> .	23
Figura 6. Vector pGEM-T-Easy.	32
Figura 7. Vector pJMS-Km.	33
Figura 8. Vector pAZBR-T7-mCherry.	34
Figura 9. A) Diagrama del contexto genético del gen <i>cdgF</i> . B) Diagrama de los dominios proteicos que constituyen a la proteína CdgF.	36
Figura 10. Modelo dCACHE_2 de la proteína CdgF.	39
Figura 11. A. Estructura secundaria del dominio dCACHE_1 de la proteína TlpC. B. Estructura terciaria del dominio dCACHE_2 de la proteína CdgF.	41
Figura 12. Posibles ligandos del dominio dCACHE_2 de la proteína CdgF.	42
Figura 13. Modelo de los dominios PAS-PAS de la proteína CdgF.	43
Figura 14. Ligandos de los dominios PAS de la proteína CdgF.	44
Figura 15. Modelado por homología de los dominios DGC-PDE de la proteína CdgF.	45
Figura 16. Ligandos de los dominios DGC-PDE de la proteína CdgF.	46
Figura 17. Modelo propuesto de la proteína CdgF mediante Chimera e I-Tasser.	47
Figura 18. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8 % de los productos de PCR de los fragmentos amplificados A y B.	48
Figura 19. Construcción pGEM-FA40391.	49
Figura 20. Construcción pGEM-FB40391	50
Figura 21. Construcción pJMS-FA40391.	51
Figura 22. Construcción pJMS-FAB40391.	52
Figura 23. Construcción pJMS-FAB40391 en <i>E. coli</i> S17.1.	53
Figura 24. Comprobación de la cepa mutante $\Delta cdgF$ <i>A. brasilense</i> 40391.	54
Figura 25. Región a amplificar del casete de gentamicina de pBBR1MCS-5.	55
Figura 26. Región a amplificar del gen <i>cdgF</i> .	56
Figura 27. Construcción pGEM- <i>cdgF</i> .	57
Figura 28. Construcción pGEM-Gm.	58
Figura 29. Construcción pAZBR-Gm.	59
Figura 30. Construcción pAZBR- <i>cdgF</i> .	60
Figura 31. Comprobación de construcciones en <i>E. coli</i> S17.1.	61
Figura 32. Comprobación de la cepa control <i>A. brasilense</i> 40392.	62

TABLA DE ABREVIATURAS.

CACHE	<u>C</u> Alcium and <u>CHE</u> motaxis
CHASE	<u>C</u> yclase/ <u>H</u> istidine kinase- <u>A</u> ssociated <u>S</u> ensing <u>E</u> xtracelular domain
DGC	Diguanilato ciclasa
di-GMP-c	Diguanilato monofosfato cíclico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eDNA	DNA extracelular
EPS	Exopolisacáridos
FAD	Flavin Adenin Dinucleótido
FMN	Flavin Mono Nucleótido
GAF	<u>c</u> GMP-specific phosphodiesterases, <u>A</u> denylyl cyclases and <u>F</u> hIA
GTP	
MASE	<u>M</u> embrane- <u>A</u> ssociated <u>S</u> ensor
MCP	proteína aceptora de grupos metilo
MHTYT	<u>M</u> et- <u>H</u> is- <u>t</u> Yr- <u>T</u> reo containing <u>Y</u> koW <u>T</u> ransmembrane domain
NIT	<u>N</u> itrate and <u>N</u> itrite-sensing
PAS	<u>P</u> er-ARNT-Sim
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PGPR	Bacterias promotoras de crecimiento vegetal
RNA	Ácido ribonucleico
RSMD	Medidas estándares de desviación cuadrática media
sRNA	Pequeños RNA

1. RESUMEN

El suelo es un sistema complejo que alberga una gran cantidad y variedad de especies vegetales, animales y de microorganismos. Estos organismos establecen relaciones entre sí en formas variables que contribuyen a generar las características propias de cada suelo. En los últimos años, se han desarrollado estrategias para reemplazar el uso de fertilizantes químicos por el uso de biofertilizantes a base de bacterias benéficas que han demostrado cumplir funciones que mantienen el equilibrio del suelo y apoyan el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos. El uso de estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se ha convertido en una de las tecnologías limpias más prometedoras para el desarrollo de la agricultura sostenible. Entre las PGPR más estudiadas se encuentran las del género *Azospirillum*. La movilidad y quimiotaxis son mecanismos importantes para que ocurra la colonización eficiente y exitosa. Mediante estos mecanismos la bacteria se dirige hacia las raíces de las plantas atraída por los exudados radiculares, siendo estos una fuente rica de nutrientes. Posteriormente la bacteria se adhiere de forma rápida, débil y reversible a la planta por medio de su flagelo polar, el cual funciona como una adhesina. Una vez unida a la planta, *Azospirillum* se ancla de forma irreversible por la producción de exopolisacáridos, y se da la formación de la biopelícula, la cual es una estrategia de vida para la mayoría de las bacterias, ya que otorga estabilidad y protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio ambiente. La formación de la biopelícula en *Azospirillum brasilense* es mediada por los niveles intracelulares de una molécula que es un segundo mensajero, denominado di-GMP-c. Además, se ha observado que en otros modelos bacterianos el di-GMP-c regula la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelícula, quimiotaxis y diferentes formas de movilidad, virulencia, resistencia a antibióticos, morfología celular, y regulación del ciclo celular. Niveles intracelulares de este segundo mensajero se encuentran regulados por enzimas que lo sintetizan llamadas diguanilato ciclasas (DGC) y por enzimas que lo degradan llamadas fosfodiesterasas (PDE). Existen proteínas que presentan tanto dominios de DGC y de PDE, las cuales se denominan proteínas híbridas. Este tipo de proteínas cuentan con dominios accesorios de señalización que detectan estímulos provenientes del medio extracelular o intracelular. Es pertinente tener un panorama de la forma en que funcionan estas proteínas, ya que en ciertas condiciones pueden funcionar como diguanilato ciclasas favoreciendo la formación de biopelícula, mientras que en otras condiciones pueden funcionar como fosfodiesterasas, favoreciendo la movilidad y quimiotaxis. Una de estas proteínas es la codificada por el gen *cdgF*, la cual es una proteína híbrida y cuenta con dos dominios de señalización PAS y dos dominios CACHE, además de que se encuentra conservada en los genomas de otras especies del género *Azospirillum*. En este estudio se construyeron la cepa mutante de este gen y la cepa complementada. Estas cepas permitirán evaluar la función de este gen, al realizar ensayos de movilidad y biopelícula correspondientes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal también conocidas por sus siglas en inglés como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) son un conjunto de bacterias que colonizan la superficie de las raíces y producen algún beneficio en ellas. El término PGPR fue acuñado y definido por Kloepper y Schroth en 1981.

Las PGPR son organismos altamente eficientes para promover el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. Para considerar a un microorganismo como PGPR, este debe cumplir con las siguientes características: una elevada densidad poblacional en la rizosfera después de su inoculación en las plantas, deben ser capaces de colonizar de forma efectiva la superficie de la raíz, y que puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta (Escalona *et al.*, 2003).

Existe una gran variedad de géneros bacterianos que promueven el crecimiento de las plantas, entre ellos se encuentran: *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Azospirillum*, siendo este último uno de los más estudiados (Gray y Smith, 2005).

La promoción del crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por diversos mecanismos entre los cuales se encuentran: disminución de los niveles de etileno, fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y síntesis de ciertas sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (como giberelinas, citocininas y auxinas). Estas últimas, estimulan la densidad y longitud de los pelos radiculares, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas, lo cual a su vez incrementa la capacidad de absorción de agua y nutrientes. Además de lo anterior, estas sustancias reguladoras pueden proteger a la planta contra distintos patógenos al promover la respuesta sistémica inducida (Bulgarelli, *et al.*, 2013; Escalona *et al.*, 1981) (Figura 1).

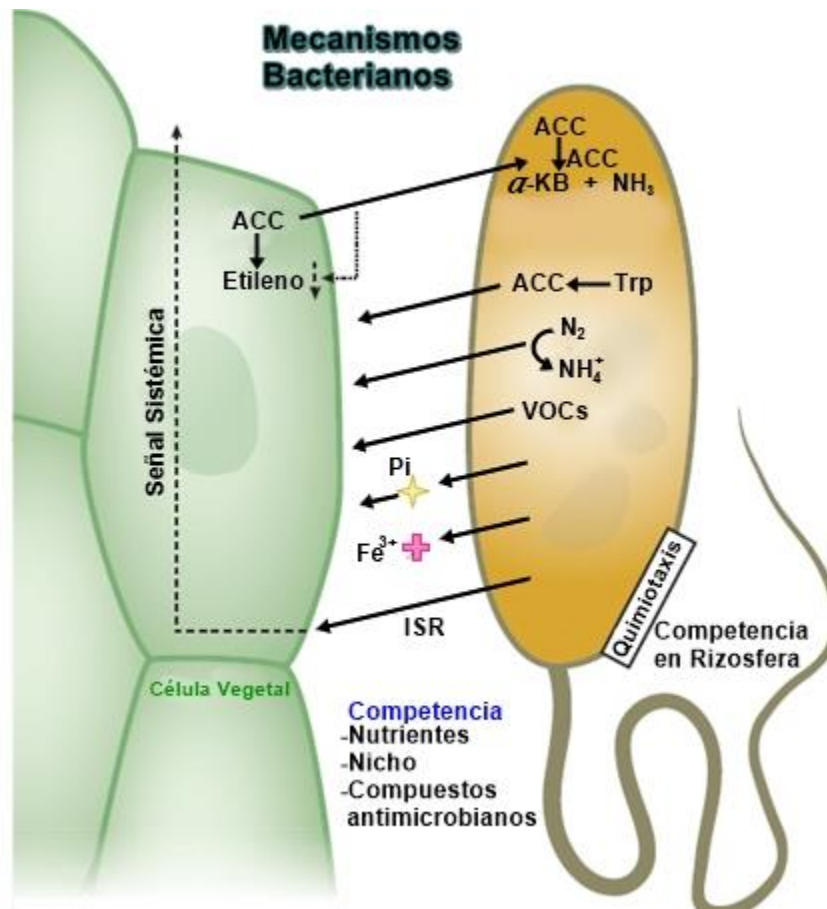


Figura 1. Mecanismos bioquímicos por los cuales las rizobacterias median la promoción del crecimiento y salud de la planta. Imagen tomada de (Tomado y modificado de Bulgarelli, *et al.*, 2013).

2.2 El género *Azospirillum*

Las bacterias del género *Azospirillum* (pertenecientes al grupo de las α -proteobacterias) han sido conocidas durante años como rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta. Existen varias características morfológicas que nos ayudan a identificar a estos microorganismos. Son bacterias de vida libre, fijadoras de nitrógeno, no fermentativas y no formadoras de esporas, con forma vibrioide o de bacilo, ligeramente curvadas con gránulos de polihidroxibutirato y pueden formar quistes. Son bacterias Gram-negativas, móviles (Pedraza *et al.*, 2020). Las colonias de *Azospirillum* desarrollan una superficie encallecida y seca después de pocos días de incubación en medio de cultivo que contenga malato. La coloración roja de estas colonias observadas en *A. brasilense* son debidas a la acumulación de pigmentos carotenoides (Pereg y McMillan 2015). Una de las características fenotípicas más ampliamente usadas para el reconocimiento del género *Azospirillum* es el color rojo

escarlata que toman las colonias al crecer en un medio adicionado con el colorante Rojo Congo (Cáceres, 1982).

El género *Azospirillum* comprende varias especies conocidas, entre las cuales se encuentran: *A. lipoferum*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. canadense*, *A. brasilense*, etc. Esta última es una de las más estudiadas en la asociación bacteria planta. Estas bacterias proliferan bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas, pero son preferencialmente microaerofílicas en presencia o ausencia de nitrógeno combinado en el medio (Pereg y McMillan 2015).

A pesar de que más de 20 especies han sido descritas dentro de este género, hasta la fecha las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* son las mejores caracterizadas bioquímica y genéticamente. Estos microorganismos colonizan más de 100 especies de plantas y se han descrito los mecanismos que utilizan para promover el crecimiento vegetal por: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas y sideróforos, control de fitopatógenos y protección contra el estrés abiótico como sequía, salinidad y presencia de compuestos tóxicos (Pedraza, *et al.*, 2020).

Las especies del género *Azospirillum* muestran un metabolismo versátil de carbono y nitrógeno, lo cual hace que se adapten fácilmente a ambientes competitivos de la rizosfera. El amonio, el nitrato, el nitrito, los aminoácidos y el nitrógeno molecular pueden servir como fuentes de nitrógeno. Ácidos orgánicos como malato, piruvato, succinato y fructosa como fuentes de carbono (Domingues, *et al.*, 2020) *A. brasilense* es una bacteria altamente móvil gracias a sus patrones mixtos de flagelación. Un flagelo polar es sintetizado durante el crecimiento en medio líquido y permite un movimiento natatorio en este medio. Adicionalmente, flagelos laterales son inducidos durante el crecimiento en medio semisólido, permitiendo a la bacteria desplazarse sobre este medio mediante movimientos tipo “swarming”. La movilidad ofrece a la bacteria la ventaja de moverse hacia condiciones favorables ricas en nutrientes. *Azospirillum* exhibe quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos, así como hacia los exudados radiculares. Otra característica de *A. brasilense* es el movimiento hacia concentraciones óptimas de oxígeno de 0.4% de oxígeno disuelto, llamada aerotaxis (Zhulin, *et al.*, 1996). Este comportamiento puede ser ventajoso para guiar a la bacteria a nichos óptimos para que lleve a cabo la fijación de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

2.3 Quimiotaxis

Los microorganismos han desarrollado una gran cantidad de estrategias para adaptarse a cambios en el medio ambiente. Algunas de estas estrategias involucran cambios en patrones de expresión de genes permitiendo que muchas bacterias sean capaces de responder rápida y transitoriamente a cambios en el ambiente. En

bacterias móviles, estas respuestas adaptativas transitorias incluyen la habilidad para navegar hacia condiciones más favorables o alejarse de las perjudiciales. Este comportamiento es referido como quimiotaxis cuando las bacterias móviles responden a gradientes de efectores químicos, aerotaxis cuando responden a gradientes de oxígeno, fototaxis cuando responden a gradientes de luz, pH taxis cuando responden a gradientes de pH, etc (Pereg y McMillan 2015).

Debido a que *Azospirillum* requiere nutrientes del medio en donde se encuentre para su crecimiento, ésta se dirige hacia los exudados radiculares de las plantas mediante quimiotaxis, donde tomará los nutrientes necesarios para su desarrollo. La quimiotaxis es considerada un rasgo importante para sobrevivir en la rizosfera, y es un mecanismo esencial para la colonización de las raíces exitosa (Wadhams y Armitage, 2004).

El sistema de transducción de señales de la quimiotaxis ha sido bien caracterizado en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, donde este regula la probabilidad de cambios en la dirección de rotación de los motores flagelares, que a su vez afectan el patrón de motilidad de nado celular. La rotación del flagelo es impulsada por el gradiente electroquímico de membrana y los interruptores en la dirección de la rotación del motor flagelar son controlados por la vía de quimiotaxis (Berg, 2003). A nivel molecular, el sistema de transducción de señales de quimiotaxis comprende una ruta de transducción de señales de dos componentes en la que la información sensorial percibida por receptores se transmite al motor a través de una serie de eventos de fosforilación modulados por el regulador de respuesta de la cinasa CheA. CheA se acopla a los receptores a través de CheW y modula el estado de fosforilación del regulador de respuesta CheY. CheY tiene una afinidad aumentada por la unión a proteínas motoras flagelares, lo que resulta en un cambio en la dirección de rotación flagelar y un cambio en la dirección de natación (Wadhams y Armitage, 2004). En *A. brasilense* se ha reportado que una vez que detecta un quimioattractante, incrementa transitoriamente la velocidad de nado y reprime las reversiones. La vía de quimiotaxis Che1 regula cambios en la velocidad de nado, mientras que el sistema Che-4 regula la probabilidad de reversiones, siendo este último esencial para la colonización competitiva en la superficie de la raíz (Mukherjee, *et al.* 2016).

Una vez que la bacteria se encuentra en un ambiente rico en nutrientes necesarios para su crecimiento, esta requiere establecerse y mantenerse en dicho ambiente, para ello es necesario que la bacteria logre colonizarlo cambiando su estado móvil (plantónico) a sésil (formación de biopelícula) en donde será necesario modular el sistema de transducción de señales para disminuir la movilidad (Monds y O'Toole, 2009).

2.4 Colonización de *Azospirillum* a la planta

El anclaje de *Azospirillum brasilense* a las raíces es considerado un requisito para la colonización de plantas. *Azospirillum* coloniza principalmente la superficie de las raíces, y algunas cepas son capaces de colonizar tejidos internos de la planta. Estudios ultraestructurales de localización de *Azospirillum* en la superficie de las raíces han mostrado que este se encuentra a lo largo del sistema radicular, pero se concentra en zonas de elongación, en heridas de la raíz, en la base de los pelos radiculares (Ramírez, *et al.*, 2018; Pedraza, *et al.*, 2020).

El proceso de colonización de *Azospirillum* a las raíces es principalmente dependiente de dos factores: (1) la existencia de un flagelo polar, que permite a la bacteria adsorberse a las raíces, y (2) la producción de exopolisacáridos (EPS), lo cual permite a la bacteria anclarse firmemente a la superficie de la raíz. Una vez ya asociada a la planta, las bacterias pueden formar comunidades complejas denominadas “biopelículas” (Salcedo, *et al.*, 2015).

2.5 Formación de biopelícula

La formación de biopelícula es una estrategia de vida importante para las bacterias, ya que ésta les brinda estabilidad y protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio, además de que contribuye a la colonización exitosa del hospedero. *Azospirillum* forma biopelículas en respuesta a varios factores ambientales (temperatura, pH, oxígeno, nutrientes, etc.) (Branda, *et al.*, 2005).

En las biopelículas, las células crecen en agregados multicelulares que se encuentran rodeadas de una matriz extracelular producida por las mismas bacterias, y pueden prevalecer en escenarios naturales, clínicos e industriales. La mayoría de los microorganismos se asocian con superficies bióticas y abióticas a través de biopelículas (Wang, *et al.*, 2019). Esta matriz está compuesta de sustancias poliméricas extracelulares, principalmente polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que proveen la estabilidad mecánica para el mantenimiento de las biopelículas. Además, median su adhesión a superficies, y forman una estructura tridimensional polimérica cohesiva que interconecta e inmoviliza transitoriamente a las células. La forma de la biopelícula es variable, siendo una multicapa simple de células o más compleja con forma de hongo con canales o poros en su interior a través de los cuales circulan el agua y nutrientes de un punto a otro (Salcedo, *et al.*, 2015).

La formación de biopelícula consta de seis etapas: (1) unión inicial de la bacteria a la superficie, (2) formación de una monocapa de células, (3) desplazamiento y multiplicación de las células para formar multicapas de microcolonias, (4) producción de la matriz extracelular por la síntesis de exopolisacáridos, (5) maduración de la biopelícula, y (6) dispersión de la biopelícula para formación de

una nueva (Karatan y Watnick, 2009). En la figura 2 se esquematiza la formación de biopelícula.

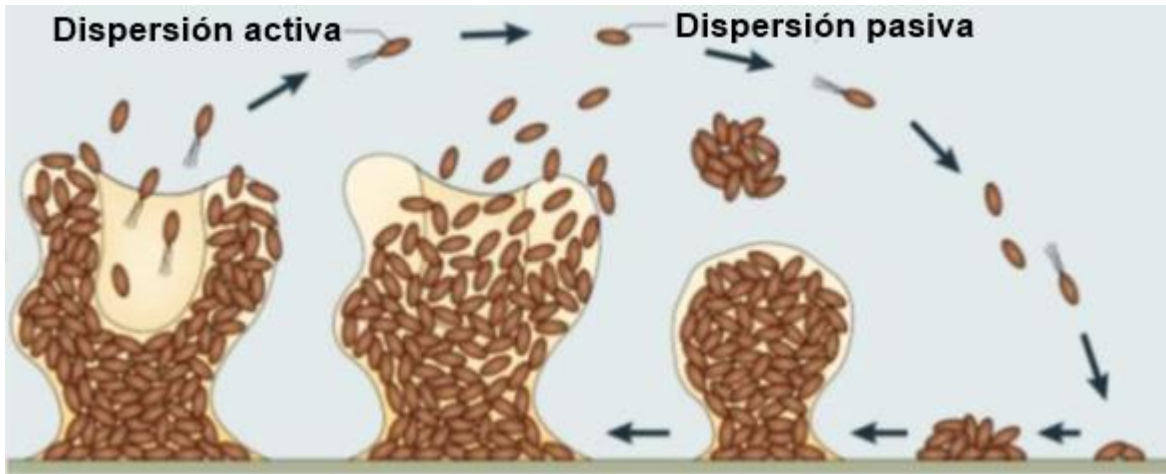


Figura 2. Formación de biopelícula. (Tomado y modificado de McDougald, *et al.*, 2011).

2.6 Transición de estilo de vida: móvil a sésil

La mayoría de las bacterias gastan mucho tiempo creciendo unidas a superficies bióticas o abióticas. La transición del estado móvil bacteriano a su unión a una superficie (estado sésil) es comúnmente asociado con el crecimiento multicelular subsecuente como una colonia y/o biopelícula. La transición de móvil a sésil involucra cinco etapas, primero la célula requiere anclarse a la superficie de las células radiculares, lo cual lo va a realizar con ayuda de su flagelo, el cual actuará como una adhesina. Esta unión es rápida y débil. Una vez anclada la bacteria sobre la superficie, esta empezará a asociarse a otras bacterias y producir exopolisacáridos, generando una biopelícula, en donde la unión se volverá más firme. Además, si la bacteria es móvil, esta necesita inhibir la movilidad lo cual le permitirá que se una a una superficie (Monds y O'Toole, 2009).

La transición del estado móvil de una bacteria hacia un estado sésil (formación de biopelícula) está regulado por segundos mensajeros. Una de las moléculas que actúan como segundos mensajeros es el diguanilato monofosfato cíclico. Dependiendo de los niveles intracelulares de este compuesto algunas bacterias pueden modular muchas actividades importantes, entre ellas el cambio de estado móvil a sésil (Römling, *et al.*, 2013).

Las PGPR producen exopolisacáridos (EPS) inducidos por el di-GMP-c para promover diferentes formas de biopelícula, floculación y anclaje a superficies bióticas y abióticas, protegiéndolas contra distintos tipos de estrés. Algunos exopolisacáridos producidos por las rizobacterias son celulosa, curdlano,

polisacáridos de glucomanos unipolares y β -glucanos. El di-GMP-c induce dos EPS específicos: Pea y Pel en *P. putida*; alginato y celulosa en *P. putida* y *P. fluorescens*, importantes para la formación de biopelícula, sin embargo esta también depende de otras adhesinas reguladas por el di-GMP-c, como proteínas Lap (del inglés, large cell-surface adhesive proteins), importante para la formación de la matriz de la biopelícula (Perez y SanJuan., 2019).

En *Azospirillum* componentes como la flagelina polar, EPS, eDNA y la proteína OmaA permiten a la bacteria convertirse en microcolonias organizadas. Estos componentes están involucrados en varias etapas de la formación de biopelícula y contribuyen a su estabilidad. *A. brasilense* se ancla a la superficie usando su flagelo polar, empieza a dividirse, a producir y acumular más EPS para anclarse a las superficies. Los componentes poliméricos extracelulares de la matriz proveen muchos beneficios a las células en la biopelícula, incluyendo adhesión, protección y estructura. Además, en el proceso de auto-agregación y la formación de una biopelícula fuerte, están involucrados EPS y proteína OmaA. Esto le permite a la bacteria sobrevivir de forma efectiva bajo condiciones adversas del medio como protección contra predación y desecación. Cuando el acceso de los nutrientes empieza a disminuir, la dispersión de la biopelícula permite a la bacteria colonizar otras superficies (Viruega, *et al.*, 2020).

Este tipo de biopelícula es importante en los microbiomas de la rizosfera. Diferentes características en las rizobacterias son reguladas por el di-GMP-c tales como el movimiento, el anclaje y la colonización, resultando un impacto positivo en la adaptación de la planta hospedera.

2.7 Di-GMP-c (Diguanilato monofosfato cíclico)

El diguanilato monofosfato cíclico (di-GMP-c), es un dinucleótido que actúa como segundo mensajero responsable del control de una gran variedad de características, entre las cuales se incluyen: la transición del estilo de vida bacteriano, la producción de exopolisacáridos, la formación de biopelícula, la quimiotaxis y diferentes formas de movilidad, virulencia, resistencia a antibióticos, morfología celular y regulación del ciclo celular. Generalmente, altos niveles de di-GMP-c se correlacionan con un “estado sésil” o formación de biopelícula; mientras que niveles bajos con un “estado móvil” o incremento de movilidad (Texeira, *et al.*, 2018).

El di-GMP-c está presente en un amplio rango de especies bacterianas. Los niveles de esta molécula son controlados a través de mecanismos de detección y regulatorios en respuesta a cambios en el medio ambiente bacteriano, los cuales alteran la fisiología y el fenotipo bacteriano (Römling, *et al.*, 2013).

En la figura 3 se puede apreciar las reacciones enzimáticas que ocurren durante el metabolismo del di-GMP-c de manera general y algunos de los fenotipos que son controlados por esta molécula.

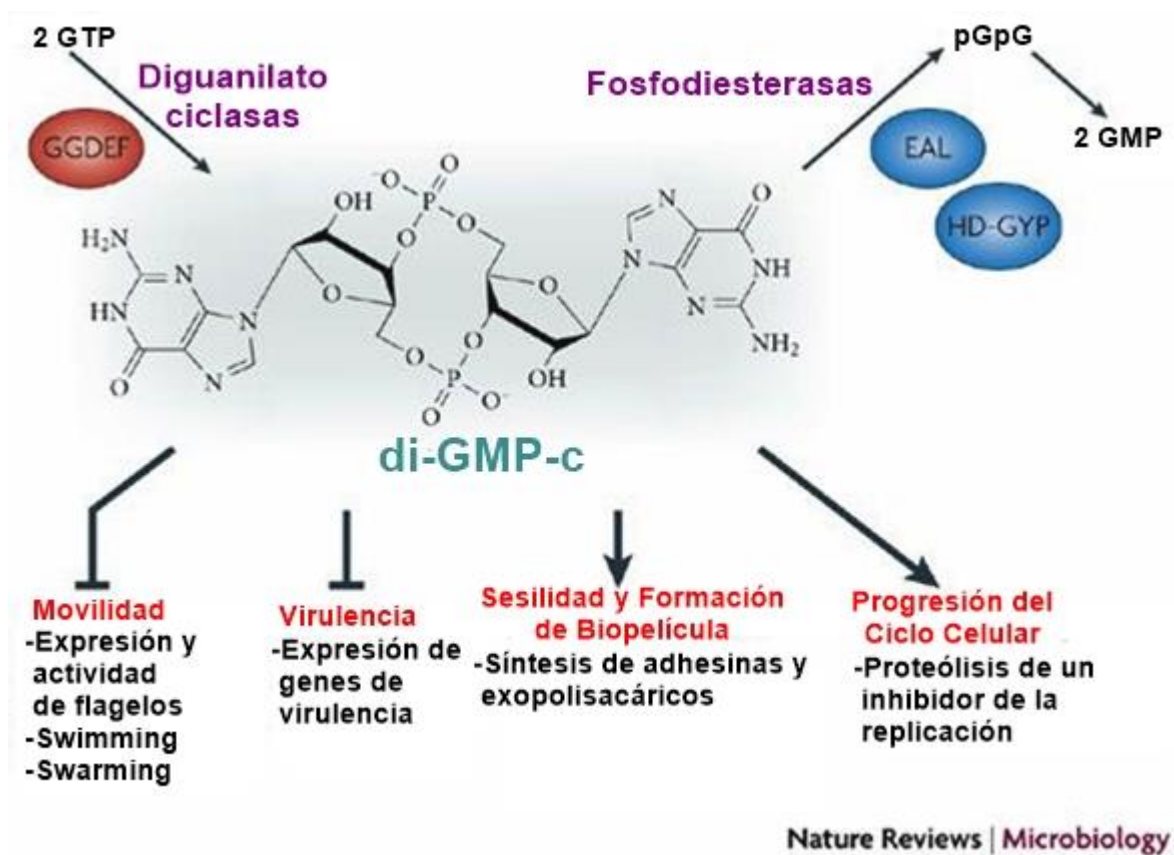


Figura 3. Estructura y funciones fisiológicas del di-GMP-c. Tomado y modificado de Hengge, 2009.

2.8 Síntesis del di-GMP-c

El di-GMP-c es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por enzimas denominadas diguanilato ciclasas (DGCs) que contienen el dominio conservado GG(D/E)EF (Gly-Gly-(Asp/Glu)-Glu-Phe). Este tipo de proteínas generalmente actúan como homodímeros, donde cada monómero contribuye con la unión de una molécula de GTP para unirlos mediante un enlace fosfodiéster utilizando cationes como Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores. En el sitio activo (sitio A), del dominio GG(D/E)EF, los primeros dos residuos (Gly-Gly) están involucrados en la unión del

GTP, mientras que el cuarto residuo (Glu) está involucrado en la coordinación del ion metálico. El tercer aminoácido de este motivo (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis e interviene en la coordinación del metal (Römling, *et al.*, 2013).

Existen dos mecanismos que parecen afectar la formación del homodímero GG(D/E)EF catalíticamente competente. El primero involucra reordenamientos conformacionales en respuesta a cambios en el dominio de señalización unidos a los dominios GG(D/E)EF. El segundo mecanismo afecta la activación / inactivación de las diguanilato ciclasas involucrando una inhibición por retroalimentación, mediante un sitio de inhibición (sitio I), el cual está constituido por un motivo de cuatro residuos RxxD (donde “R” es arginina, “x” es cualquier residuo y “D” es ácido aspártico) y posicionado cinco aminoácidos río arriba del motivo GG(D/E)EF (Römling, *et al.*, 2013).

2.9 Hidrolisis del di-GMP-c

El di-GMP-c es degradado por enzimas denominadas fosfodiesterasas (PDEs), las cuales se dividen en dos grupos: el primero tienen el dominio catalítico EAL (Glu-Ala-Leu) el cual cataliza la hidrolisis del di-GMP-c generando 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG); mientras que el segundo posee el dominio catalítico HD-GYP, el cual lo hidroliza hasta generar dos moléculas de GMP. La actividad catalítica de proteínas con el dominio EAL depende de un grupo de dos cationes metálicos, los cuales coordinan dos moléculas de agua, una de las cuales está involucrada en el ataque hidrofílico del enlace fosfodiéster del di-GMP-c. Los dominios EAL por lo general actúan como homodímeros. Este tipo de proteínas requiere de los cofactores Mn^{2+} y Mg^{2+} para tener actividad. En cuanto a la regulación de estas proteínas dependerá de los dominios accesorios ubicados en el extremo N-terminal que posee la proteína; la presencia de Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} puede inhibir la reacción (Römling, *et al.*, 2013).

2.10 Proteínas híbridas con dominios DGCs y PDEs

Frecuentemente se pueden encontrar dominios GG(D/E)EF y EAL en la misma cadena polipeptídica como parte de proteínas multidominio o proteínas híbridas. Existen tres posibles teorías de cómo se pueden encontrar o funcionar estos dominios: el primer escenario es que ambos dominios son enzimáticamente activos, los cuales son regulados de forma diferente por señales del medio ambiente o intracelulares de tal manera que en un momento dado, una actividad es prevalente. En el segundo escenario, uno de los dos dominios es enzimáticamente inactivo o catalíticamente incompetente; se ha visto que en algunas proteínas a pesar de que esté conservado el motivo catalítico, este dominio no tiene actividad y en otros casos el dominio puede estar degenerado y por lo tanto es inactivo. Los dominios degenerados han evolucionado para llevar a cabo nuevas funciones, por ejemplo,

pueden funcionar como sitio de unión para un ligando que regularía la actividad enzimática del otro dominio, unión pero no procesamiento del sustrato, participación en interacciones proteína-proteína y/o proteína-RNA. En el tercer escenario, ambos dominios son catalíticamente inactivos, este tipo de proteínas con dominios degenerados pueden actuar como receptores del di-GMP-c para continuar con la cascada de señalización al interactuar con otra molécula receptora o efectora (Römling, *et al.*, 2013).

2.11 DGCs y PDEs asociadas a dominios de señalización

Las bacterias frecuentemente poseen múltiples genes que codifican para DGCs y PDEs, además pueden tener dominios de señalización, que pueden regular su actividad mediante la detección de señales del medio ambiente. Estos dominios involucrados en sistemas de transducción de señales pueden ser, por ejemplo: GAF (del inglés: cGMP phosphodiesterase, **A**denyl cyclase, **F**hlA), PAS (del inglés: **P**ER, **A**RNT, and **S**IM proteins), CACHE (del inglés: **Ca**²⁺ channels and **C**hemotaxis receptors), HAMP (del inglés: **H**istidine kinases, **A**denyl cyclases, **M**ethyl-accepting proteins and **P**hosphatases), el dominio receptor o regulador de respuesta de los sistemas de doble componente (REC), entre otros; los cuales reconocen pequeñas moléculas y subsecuentemente activan el dominio receptor, dando lugar a cambios funcionales en la fisiología bacteriana, factores de virulencia, incluyendo la movilidad (Römling, *et al.*, 2013). Algunas características de estos dominios se mencionarán a continuación:

- Los dominios PAS (del inglés: **P**ER, **A**RNT, and **S**IM proteins) se distribuyen ampliamente en las bacterias, arqueobacterias y eucariotas. Se encuentran frecuentemente correlacionados con procesos de transducción de señales y pueden detectar diversas señales como el oxígeno, la luz, el potencial redox, el voltaje y los hidrocarburos aromáticos.
- Los dominios GAF (del inglés: cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA) son dominios de señalización que se localizan en el citoplasma, son parecidos estructuralmente a los dominios PAS, se describieron originalmente como dominios conservados de unión a GMPc en fosfodiesterasas. Estos dominios son estructuralmente similares, comparten un pliegue con los dominios PAS.
- Los dominios CACHE (del inglés: CAlcium and CHEmotaxis) propios de los canales de calcio y de los receptores de quimiotaxis, son dominios extracelulares de estructura similar a los dominios PAS. La diferencia estructural de ambos es la gran alfa hélice N-terminal presente en dominios CACHE. Los dominios CACHE se clasifican estructuralmente en dos grupos sCACHE (un solo dominio) y dCACHE (dos dominios), compartiendo la gran α -hélice N-terminal y difiriendo en la estructura de las hojas plegadas y alfas hélices presente en los CACHE de dominio único o doble.

- Los dominios CHASE (del inglés: Cyclase/Histidine kinase-Associated Sensing Extracelular domain), también son dominios extracelulares.
- El dominio MHYT (del inglés: Met-His-tYr-Treo containing YkoW transmembrane domain) es un dominio transmembranal que consiste de seis segmentos transmembranales interconectados por regiones citoplasmáticas y regiones periplásmicas cortas ricas en arginina, la función de este dominio no se conoce, pero podría formar centros de cobre útiles en la detección de oxígeno, del óxido nítrico y del monóxido de carbono.
- El dominio NIT (del inglés: Nitrate and Nitrite-sensing) que podría detectar nitrato y nitrito.
- Los dominios MASE1 y MASE2 (del inglés: Membrane-Associated Sensor) podrían participar en la detección del hierro y oxígeno, aunque su función aún no está bien definida (Méndez, *et al.*, 2005).

2.12 Receptores del di-GMP-c

El di-GMP-c regula una gran variedad de procesos celulares, incluyendo: la transición del estilo de vida móvil a sésil, motilidad celular, interacciones intercelulares, formación de biopelícula y dispersión, y las respuestas al oxígeno, óxido nítrico y a una gran variedad de señales ambientales. Hay una sorprendente diversidad de efectores y blancos del di-GMP-c, como consecuencia, cualquier tipo de proceso en una célula bacteriana puede ser controlada por este segundo mensajero (Prada, 2014).

Un segundo mensajero como el di-GMP-c tiene que ser detectado, ya sea por unión específica a un componente efector específico o a un receptor que interactúe con un blanco específico para ejercer efectos celulares. Estos efectores pueden actuar a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona. Se han predicho varias clases de receptores del di-GMP-c, por ejemplo, reguladores transcripcionales, ribonucleasas, glicosiltransferasas, pequeños ARN (sRNA) llamados “riboswitches”, proteínas con dominios PilZ, proteínas estructurales del pilus tipo IV e incluso las mismas DGC y PDE desprovistas de actividad catalítica por la presencia del dominio degenerado, receptores del sitio I. En la figura 4 se muestran de manera general los efectores del di-GMP-c.

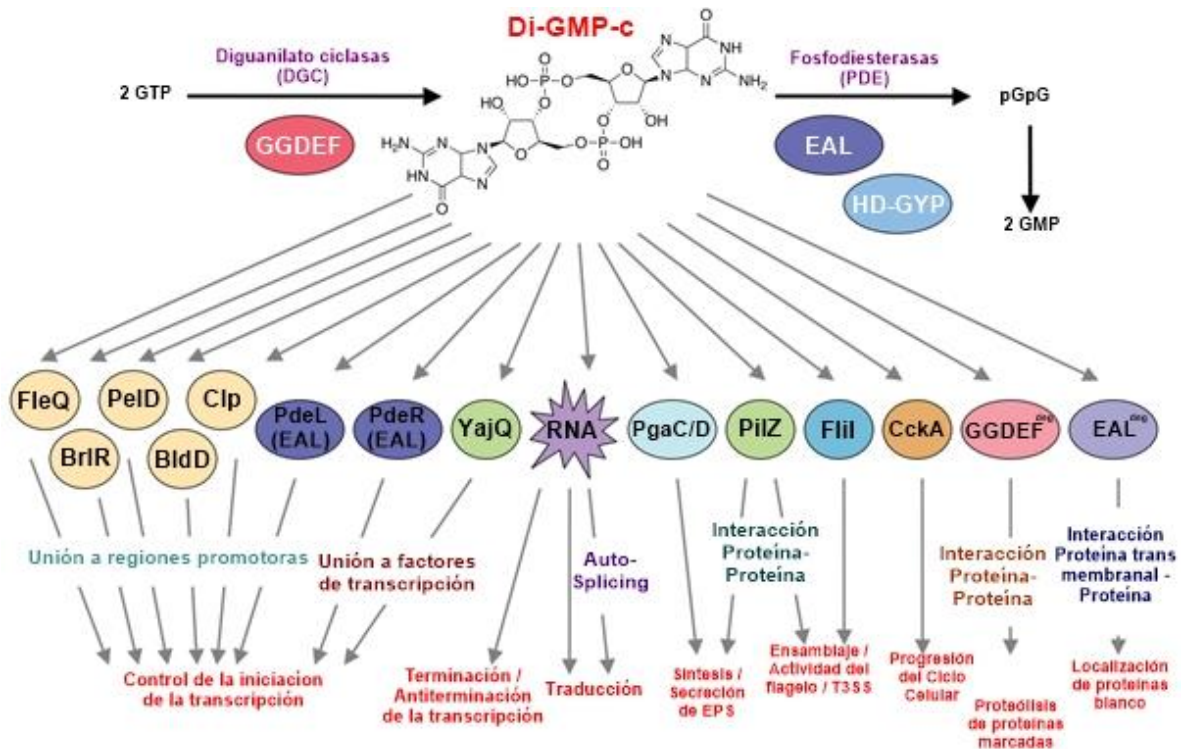


Figura 4. Diversidad de factores de unión del di-GMP-c (Tomado y modificado de Hengge, 2016).

2.13 Efectores del di-GMP-c.

- Dominios PilZ.** Proteínas con dominios PilZ son capaces de unir di-GMP-c y afectar a la velocidad de rotación del flagelo. El primer receptor estudiado para el di-GMP-c en bacterias, forma parte de la glicosiltransferasa de *Gluconacetobacter xylinus* para la síntesis de celulosa. El dominio llamado originalmente PilZ de *Pseudomonas aeruginosa*, está involucrado en la formación del pilus tipo IV (Amikam y Galperin, 2005). Se han identificado otros dominios PilZ en otros modelos bacterianos, los cuales sufren cambios conformacionales que modulan su actividad y / o la de otras proteínas tras la unión específica del di-GMP-c (*V. cholerae*, *C. crescentus*, *P. aeruginosa*), inducen la secreción de celulosa a través de la membrana celular, activación alostérica de la síntesis y secreción de distintos EPS, activan la producción de alginato, Psl o Pel. Otros dominios PilZ están implicados en la movilidad o en la quimiotaxis. Por ejemplo, el efecto negativo de los niveles del di-GMP-c sobre la motilidad flagelar está mediado por dominios PilZ, denominados frenos moleculares o YcgR, las cuales se unen al motor del flagelo en complejo con el di-GMP-c y disminuyen la frecuencia de rotación y, por lo tanto, de motilidad (Prada, 2014). En *A. brasilense* la proteína aceptora de

grupos metilo (MCP) Tlp1 juega un rol importante en aerotaxis y colonización de las raíces. Tlp1 es un receptor de quimiotaxis que cuenta con una parte proteica anclada en la membrana, con un dominio sensor N-terminal y un dominio de señalización citoplasmático. El ligando de Tlp1 es desconocido, pero el receptor también posee un dominio PilZ C-terminal, el cual se une a di-GMP-c con una afinidad baja micromolar, promoviendo el nado así como la velocidad de éste (O'Neal, *et al.*, 2019). MrkH un regulador de la transcripción en *Klebsiella pneumoniae*, en cuya estructura se encuentra un dominio PilZ, se une al di-GMP-c e inicia la transcripción de genes que codifican la formación y producción de la fimbria tipo 3 que interviene en la estructura de la matriz de la biopelícula (Wilksch, *et al.* 2011).

- **Motivos similares al sitio I.** Un motivo similar al sitio I (sitio de inhibición), RxxD es responsable de la unión del di-GMP-c con otros dos receptores, PleD de *P. aeruginosa* y CdgG de *V. cholerae* (Chan, *et al.*, 2004).
- **DGCs y PDEs con dominios degenerados.** Proteínas con motivos degenerados, en los cuales un residuo importante para la catálisis es reemplazado por otro residuo aminoacídico. Se ha observado que los genomas bacterianos codifican un alto número de proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados, los cuales no son catalíticamente activos, sin embargo, pueden unir di-GMP-c u otros nucleótidos. Por ejemplo, la proteína PopA de *C. crescentus*, implicada en la progresión del ciclo celular posee un dominio degenerado GGDEF y un sitio de inhibición I. PopA localizada en el polo celular, se une al di-GMP-c a través de su sitio I, y dirige al regulador global del ciclo celular CtrA a esta localización, permitiendo la progresión del ciclo celular (Prada, 2014).

Algunos sitios GGDEF degenerados pueden unir GTP, sirviendo quizás como sensores del estado energético de la célula. Del mismo modo, ciertos dominios EAL degenerados conservan la capacidad de unión del di-GMP-c. Por ejemplo, proteína LapD de *P. fluorescens* Pf0-1 contiene dominios GGDEF y EAL degenerados, que une al di-GMP-c, lo que activa la secreción de la adhesina LapA (Prada, 2014).

- **Reguladores transcripcionales y otras proteínas efectoras.** Se han descrito una gran cantidad de proteínas que unen di-GMP-c, pero sus dominios de unión no están identificados. Este es el caso de FleQ de *P. aeruginosa* (regulador maestro de la biosíntesis flagelar, regula positivamente la expresión de varios operones implicados en la síntesis de EPS tras unir de manera específica di-GMP-c), VpsR de *V. cholerae* (regulador central de la cascada de la virulencia y Quorum sensing, además de participar como activador de la formación de biopelícula) y Clp de *Xanthomonas campestris* (Clp activa la expresión de varios genes implicados en la virulencia y el di-GMP-c inhibe esa expresión) (Prada, 2014). Proteínas CheY-Like (Cle) de *C. crescentus*, sintonizan la actividad flagelar en

respuesta a la unión del di-GMP-c en la extensión C-terminal (Nesper, *et al.*, 2017).

- **Riboswitches.** Regulan un amplio número de procesos celulares, incluyendo la expresión de genes asociados a la virulencia, formación de pili o biosíntesis de flagelos. Estos son aptámeros de ARN, segmentos no codificantes de ARNm que adoptan estructuras secundarias específicas y se unen a ligandos moleculares pequeños. Tras la unión del ligando, las estructuras secundarias específicas del ARNm cambian, lo que resulta en cambios en la transcripción, la estabilidad del ARNm o la traducción de genes posteriores. El riboswitch Cd1 de *Clostridium difficile* que se encuentra antes del operón del flagelo trabaja como un interruptor “apagado”, el cual en presencia de di-GMP-c, causa la terminación transcripcional y disminuye la expresión de genes en el hospedero heterólogo *Bacillus subtilis* (Römling, *et al.*, 2013).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de la Interacción Bacteria – Planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del ICUAP, se realizaron análisis bioinformáticos en el genoma de diferentes cepas del género *Azospirillum* buscando secuencias presuntivas que codifican para enzimas diguanilato ciclasas de dominio único, fosfodiesterasas de dominio único y proteínas híbridas con ambos dominios (Ver tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de genes codificantes para proteínas con dominios GGDEF, EAL y proteínas híbridas en el genoma de cepas de *Azospirillum* (Tomado de Ramírez, et al., 2018).

DOMINIO	<i>A. brasilense</i> sp245	<i>A. brasilense</i> sp7	<i>A. brasilense</i> Az39	<i>A. lipoferum</i> 48	<i>Azospirillum</i> B510	<i>A. Thiophilum</i> BV-S	<i>A. halopraeferens</i> DMS3675	<i>A. oryzae</i> A2P	<i>A. humicireducens</i> Sg-Z-5	
GGDEF	20	20	20	19	19	17	20	19	14	14
EAL	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4
Híbridas	10	9	10	16	17	13	14	17	11	11
Total	35	34	35	40	41	34	38	40	29	29

Datos extraídos de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> / base de datos SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>

En este análisis informático se encontró que en la cepa *A. brasilense* Sp245 se encuentran 35 genes que codifican para proteínas con estos dominios, de las cuales 20 son de dominio único GGDEF, 5 EAL y 10 proteínas híbridas (Ramírez, et al., 2018).

3.1 *cdgF* de *A. brasilense* Sp245

Entre los genes que codifican para proteínas híbridas, se encuentra el gen *cdgF* que codifica para la proteína CdgF (putativa diguanilato ciclasa / fosfodiesterasa (dominios GGDEF y EAL, respectivamente) la cual tiene una longitud de 1080 aminoácidos y un peso molecular de 121 KDa y se encuentra conservada en el genoma de las distintas cepas de *Azospirillum* analizadas (Ramírez, et al., 2018). El análisis *in silico* de esta proteína predice que posee dos dominios de señalización CACHE, dos dominios de señalización PAS, dos regiones transmembranales, un dominio de GGDEF y un dominio EAL degenerado (en donde el aminoácido Alanina es reemplazado por una Glicina). En la figura 5 se puede observar los dominios predichos por análisis bioinformático. El gen que codifica para esta proteína se encuentra entre genes que codifican para distintas proteínas, en donde arriba se encuentra una proteína de función desconocida y una de presunta proteína implicada en reparación de DNA; mientras que abajo se encuentran una adenil-succinato liasa y una proteína de función desconocida. En la figura 5 se puede observar el contexto genético de este gen.

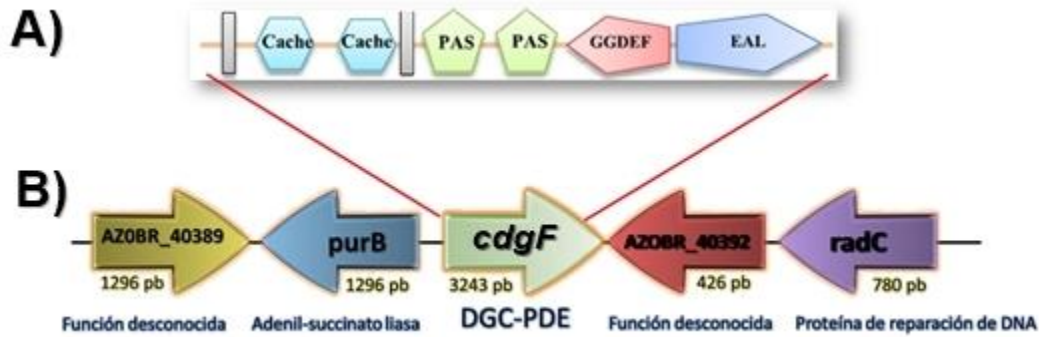


Figura 5. Contexto genético y proteico del gen *cdgF* A) Dominios proteicos de CdgF. Se muestran dos dominios transmembranales representado por barras de color gris, un doble dominio CACHE (dCACHE_2) representado por hexágonos de color azul, dos dominios PAS representado por pentágonos de color verde, un dominio de DGC y uno de PDE representados por pentágono rojo y azul respectivamente. B) Contexto genético del gen *cdgF*. Se muestra el gen de interés en flecha de color verde (*cdgF*) y los genes que se encuentran río arriba y río abajo del mismo. Datos obtenidos de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://smart.embl-heidelberg.de/>

Salazar en 2017, clonó un fragmento del gen *cdgF* de 2011 pb que codifica para la región citoplasmática de la proteína CdgF (la cual incluye los dos dominios PAS, el dominio GGDEF-EAL) en el vector pGEX-4t-1 realizando una fusión traduccional con la GST, la cual se ha utilizado como una etiqueta para la expresión de proteínas recombinantes ya que esta proteína es altamente soluble al expresarse en *E. coli*. Con este método se logró expresar y purificar la proteína, para posteriormente realizar los ensayos de actividad enzimática para analizar la actividad de DGC y PDE. Al realizar los análisis enzimáticos de fosfodiesterasa se encontró que esta proteína presenta actividad de PDE, y la actividad aumenta hasta tres veces cuando se le agrega el cofactor Flavin Adenin Dinucleótido FAD (5 μ M), lo cual indica que el dominio PAS podría estar interaccionado con el FAD y aumentar la función de PDE, activando de manera alostérica al dominio EAL. Con respecto a los análisis enzimáticos de actividad de diguanilato ciclasa se encontró que esta proteína no presentó actividad de DGC, indicando probablemente que el dominio GGDEF no presenta actividad catalítica, pero si pudiera jugar un papel regulatorio en la activación alostérica del dominio EAL. Sin embargo, también es probable que al haber removido la región N-terminal transmembranal de la proteína se afectó la conformación del dominio GGDEF resultando en la pérdida o inhibición de la actividad, o bien no se obtuvo actividad de DGC debido a que no se eliminó la etiqueta GST fusionada en el extremo N-terminal de la región citoplasmática de la proteína CdgF. Esta etiqueta de 25 KDa se encuentra cerca del dominio GGDEF lo cual podría estar interfiriendo con la formación del dímero entre los dominios y por consiguiente no se dé la formación del di-GMP-c (Salazar, 2017).

Con los resultados anteriores se definió que la proteína presenta actividad de fosfodiesterasa y no se determinó que presente actividad de diguanilato ciclasa bajo las condiciones estudiadas *in vitro*, por lo cual sería interesante analizar su función

in vivo, es decir, para lo cual es importante obtener una mutante por remoción del gen *cdgF*, una complementación en *cis* del gen *cdgF*, para en estudios posteriores poder evaluar la participación del gen en la movilidad y formación de biopelícula, fenotipos asociados con la actividad de fosfodiesterasa y diguanilato ciclasa, respectivamente.

4. HIPOTESIS

La inactivación del gen *cdgF* eliminará su participación en la movilidad y formación de biopelícula en *A. brasilense* Sp245.

5. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Las DGC y PDE son enzimas que pueden ser de dominio único o proteínas híbridas. Además, hay varios genes que las codifican en un mismo género bacteriano. Es importante explorar la función de las proteínas híbridas que contienen dominios GGDEF y EAL para conocer su participación en la fisiología microbiana del segundo mensajero di-GMP-c, debido a que presentan ambos dominios, además de que cuentan con dominios accesorios de señalización que detectan estímulos provenientes del medio extracelular o intracelular para activarlas. Es pertinente tener un panorama de la forma en que funcionan estas proteínas, ya que en ciertas condiciones pueden actuar como diguanilato ciclasas favoreciendo la formación de biopelícula, mientras que en otras condiciones pueden funcionar como fosfodiesterasas, favoreciendo la movilidad y quimiotaxis. Una de las proteínas híbridas de interés, es CdgF codificada por el gen *cdgF*, la cual de acuerdo con análisis bioinformático sugerimos que se encuentra anclada a la membrana, con dos dominios CACHE que participan como receptores de quimiotaxis, dos dominios sensores PAS, un dominio GGDEF conservado y el dominio EAL, cuyo motivo esta degenerado (EGL) (Ver figura Anexo A1), no obstante a esta degeneración hemos visto que tiene actividad de PDE. Con los estudios realizados por Salazar en el 2017, al expresar y purificar la región citoplasmática de esta proteína, para posteriormente realizar ensayos de actividad enzimática de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, se demostró que la proteína presenta actividad de fosfodiesterasa pero no presentó actividad de diguanilato ciclasa. Debido a que la proteína purificada solo contenía los dominios PAS, probablemente los dominios CACHE son lo que están involucrados en la activación del dominio GGDEF, o la etiqueta GST utilizada para una mejor purificación interfiere con la conformación adecuada para que se activen los dominios GGDEF. A pesar de que el motivo GGDEF esta conservado, esta no presentó dicha actividad, por lo cual se pretende construir una mutante por delección del gen *cdgF* para identificar posteriormente su participación *in vivo*.

Con el objetivo de evaluar la función del gen *cdgF* en la movilidad y formación de biopelícula, se obtuvo la cepa mutante *A. brasilense* 40391 (eliminando el gen *cdgF*) y la cepa complementada con el gen la región promotora nativa cepa anotada como *A. brasilense* 40393. Las cuales en estudios posteriores permitirán evaluar distintas condiciones de crecimiento para poder encontrar bajo cuales condiciones la proteína actúa como DGC y bajo cuales como PDE.

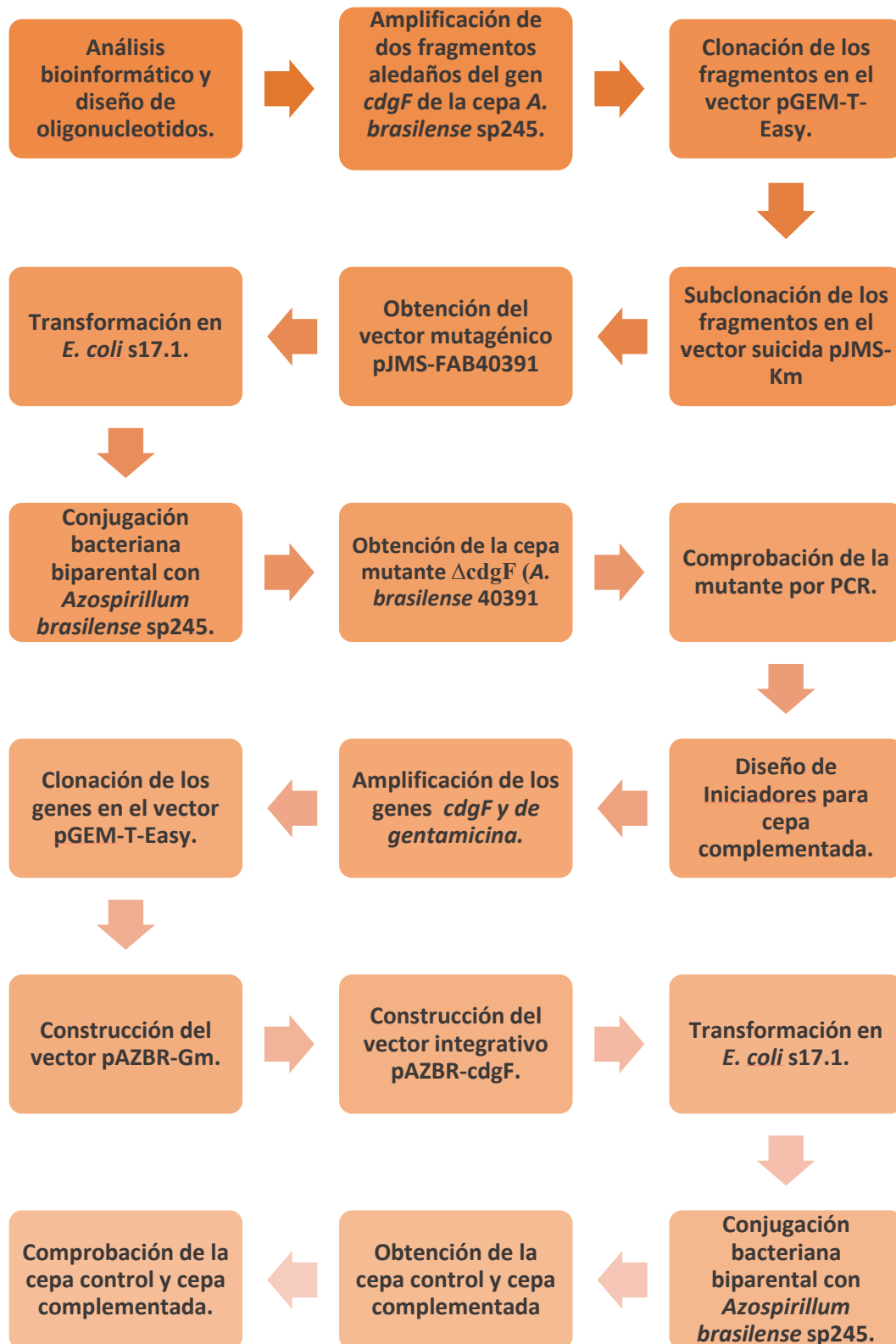
6. OBJETIVO GENERAL

Generar la cepa mutante y cepa complementada del gen *cdgF* de *A. brasilense* Sp245.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis bioinformático del modelado por homología de la proteína CdgF.
- Construcción del plásmido mutagénico denominado **pJMS-FAB40391**
- Obtención de la cepa mutante $\Delta cdgF$ (*A. brasilense* 40391)
- Construcción del plásmido para complementar en *cis* pAZBR-Gm
- Construcción del plásmido integrativo **pAZBR-*cdgF***
- Obtención de la cepa mutante complementada con *cdgF* (*A. brasilense* 40393)

8. ESQUEMA DE TRABAJO



9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Análisis bioinformático.

Para el diseño de los oligonucleótidos y la construcción de los vectores utilizados en este trabajo se emplearon los siguientes programas:

- Oligoanalyzer Tool (URL: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>)
- GeneBank (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- SnapGene (URL: <https://www.snapgene.com>)

Para el modelado por homología de la proteína se usaron los siguientes programas:

- I-Tasser (URL: <https://www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>)
- Chimera (URL: <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>)
- MolProbity (URL: <http://www.molprobity.biochem.duke.edu/index.php>)

9.2 Cepas bacterianas utilizadas

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo o Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>F</i> , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , $\Phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA^{-}argF)$, <i>U169</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺), λ ⁻	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> s17.1	<i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR-M</i> + <i>RP4-2-Tc::Mu::Km:Tn7</i>	Simon <i>et al.</i> 1983
<i>A. brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre aislada de las raíces de trigo	Baldani <i>et al.</i> 1983
<i>A. brasilense</i> 40391	Cepa derivada de <i>A. brasilense</i> Sp245 mutada en el gen <i>cdgF</i> , <i>Km</i> ^R .	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 40392	Cepa derivada de <i>A. brasilense</i> 40391 mutada en el gen <i>cdgF</i> , <i>Km</i> ^R , <i>Gm</i> ^R . (Cepa control).	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 40393	Cepa derivada de <i>A. brasilense</i> 40391 mutada en el gen <i>cdgF</i> , <i>Km</i> ^R , <i>Gm</i> ^R , complementada con gen <i>cdgF</i> . (Cepa complementada).	Este estudio

9.3 Plásmidos utilizados

Tabla 3. Vectores utilizados en este estudio.

Vectores	Genotipo o Fenotipo	Referencia
pGEM-T-Easy	Sitio de iniciación de la transcripción de T7 RNA polimerasa, múltiple sitio de clonación, promotor SP6 RNA polimerasa (-17 a +3), sitio de inicio de la transcripción SP6 RNA polimerasa, sitios de unión a primer para secuenciación M13, <i>lacZ</i> , operador <i>lac</i> , Ap ^R , región fago f1, secuencias del operon <i>lac</i> .	Promega
pGEM-FA	Derivado del vector pGEM-T-Easy, fragmento A clonado.	Este estudio
pGEM-FB	Derivado del vector pGEM-T-Easy, fragmento B clonado.	Este estudio
pGEM-Gm	Derivado del vector pGEM-T-Easy, casete de gentamicina clonado.	Este estudio
pGEM-cdgF	Derivado del vector pGEM-T-Easy, gen <i>cdgF</i> clonado.	Este estudio
pJMS-Km	Vector suicida derivado de pSUP202, gen de resistencia flanqueado con dos sitios múltiples de clonación,	(Ramírez, <i>et al.</i> 2016)
pJMS-FA	Derivado de pJMS-Km, fragmento A clonado.	Este estudio
pJMS-FAB	Derivado de pJMS-FA, fragmento B clonado.	Este estudio
pAZBR-T7-Km-mChery	Vector suicida, regiones homologas AZBR40048 y AZBR40049, terminador T7, Gen de la proteína fluorescente <i>mChery</i> , gen de resistencia a kanamicina.	(Marcos, 2016)
pAZBR-T7-Gm	Vector suicida derivado de pAZBR-T7-Km-mchery, regiones homologas AZBR40048 y AZBR40049, Terminador T7, gen de resistencia a gentamicina.	Este estudio
pAZBR-cdgF	Vector suicida derivado de pAZBR-T7-Gm, gen <i>cdgF</i> con su propia región promotora.	Este estudio

9.4 Iniciadores utilizados

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizadas en este estudio.

Iniciador	Características	Longitud	%GC	TM °C
AB40391FA	5' AA GGTACCACCGAGAAGTAGAAGGCG 3' Sitio de restricción <i>KpnI</i> es el que está marcado con rojo	18	56	59
AB40391RA	5' GGCTCGAG GGCAAGTTCAAGGTGAGG 3' Sitio de restricción <i>XhoI</i> es el que está marcado con rojo	18	56	59
AB40391CFB	5' AA GAGCTCAGACGGAGGAGCAGTTTCG 3' Sitio de restricción <i>SacI</i> es el que está marcado con rojo	18	61	59
AB40391CRB	5' GA ACTAGTGTGCTGCTGGACTACTG 3' Sitio de restricción <i>SpeI</i> es el que está marcado con rojo	18	61	59
Km-F	5' AGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT 3'	23	56	60
Km-R-R	5' CAGTGACAACGTCGAGCACAG 3'	21	57	60
GmFXhoI	5' TGCCTCGAG GCACCTTGTCGCCTTGCGTA 3' Sitio de restricción <i>XhoI</i> es el que está marcado con rojo	20	60	65
GmRSpeI	5' TG ACTAGTCCTGGCGGCGTTGTGACAATT 3' Sitio de restricción <i>SpeI</i> es el que está marcado con rojo	21	57.1	65
c-AB40391F	5' AAGAATTC ATGCGTTTGGGCCATTGCCATG 3' Sitio de restricción <i>EcoRI</i> es el que está marcado con rojo	22	54.54	65
c-AB40391R	5' AACTCGAG GTAAGACCGCTTTCGCAGCGCA 3' Sitio de restricción <i>XhoI</i> es el que está marcado con rojo	22	59.09	65
CMP- <i>PstI</i> F	5' AAGAATTC ATGCGTTTGGGCCATTGCCATG 3' Sitio de restricción <i>PstI</i> es el que está marcado con rojo	22	54	65
MTF- <i>NcoI</i> R	5' AACTCGAG GTAAGACCGCTTTCGCAGCGCA 3' Sitio de restricción <i>XhoI</i> es el que está marcado con rojo	22	59	65

9.5 Condiciones de crecimiento

***Escherichia coli* DH5 α**

Se creció en medio LB con alguno de los antibióticos de selección dependiendo de la construcción: ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) o gentamicina (15 $\mu\text{g/ml}$). En el caso de placas de LB se les anexó 1.5% de agar bacteriológico. En ambos casos, se incubaron durante 24 horas a 37 °C en agitación cuando correspondió a cultivos en líquido.

Medio LB con 1.5% de agar bacteriológico. Placas LB con antibiótico de selección, se incubó 24 horas a 37 °C.

***A. brasilense* Sp245**

El medio mínimo con malato se utilizó para el crecimiento de cepas de *A. brasilense*. Es un medio mínimo de mantenimiento. Las cepas se crecieron en medio líquido K-malato en presencia del antibiótico de selección kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) para la cepa mutante o gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) para la complementada. Para contraseleccionar se añadió tetraciclina (15 $\mu\text{g/ml}$), se incubó durante 48 horas a 30 °C en agitación.

En el caso de la selección de cepas transconjugantes, éstas se crecieron en medio mínimo con lactato como única fuente de carbono. En el caso de las placas, se le anexó al medio 1.5% de agar bacteriológico en presencia del antibiótico de selección o contraselección correspondiente, se incubó durante 48 horas a 30 °C en cámara húmeda.

El medio Rojo Congo permitió el crecimiento y diferenciación de *Azospirillum* spp. de otras bacterias del suelo debido a la presencia del colorante rojo Congo, el cual es absorbido por las células produciendo colonias de color rojo escarlata. Es un medio útil para analizar la pureza del cultivo y descartar contaminación con *E. coli* después de un proceso de conjugación. Las placas de Rojo Congo contenían 1.5% de agar bacteriológico con el antibiótico de selección o contraselección, se incubaron durante 48 horas a 30 °C en cámara húmeda.

9.6 Construcción de pGEM-FA y pGEM-FB.

Se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción *Xho*I y *Kpn*I para amplificar el fragmento A (947 pb) que codifica para una adenil succinato liasa ubicado río arriba del gen *cdgF*. Para el fragmento B (1047 pb) río abajo se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción *Spe*I y *Sac*I, este codifica para una proteína de función desconocida.

A partir de DNA genómico de *A. brasilense* Sp245 se amplificaron ambos fragmentos por PCR (ver condiciones en tabla anexo 1 y tabla anexo 2) y se clonaron en el vector de almacenamiento pGEM-T-Easy (Figura 6), siguiendo el protocolo del proveedor (PROMEGA). El producto de clonación se transformó en *E. coli* DH5 α , las clonas seleccionadas se verificaron y comprobaron por PCR y

restricción (AB40391FA y AB40391RA para el fragmento A; AB40391FB y AB40391RB para el fragmento B).

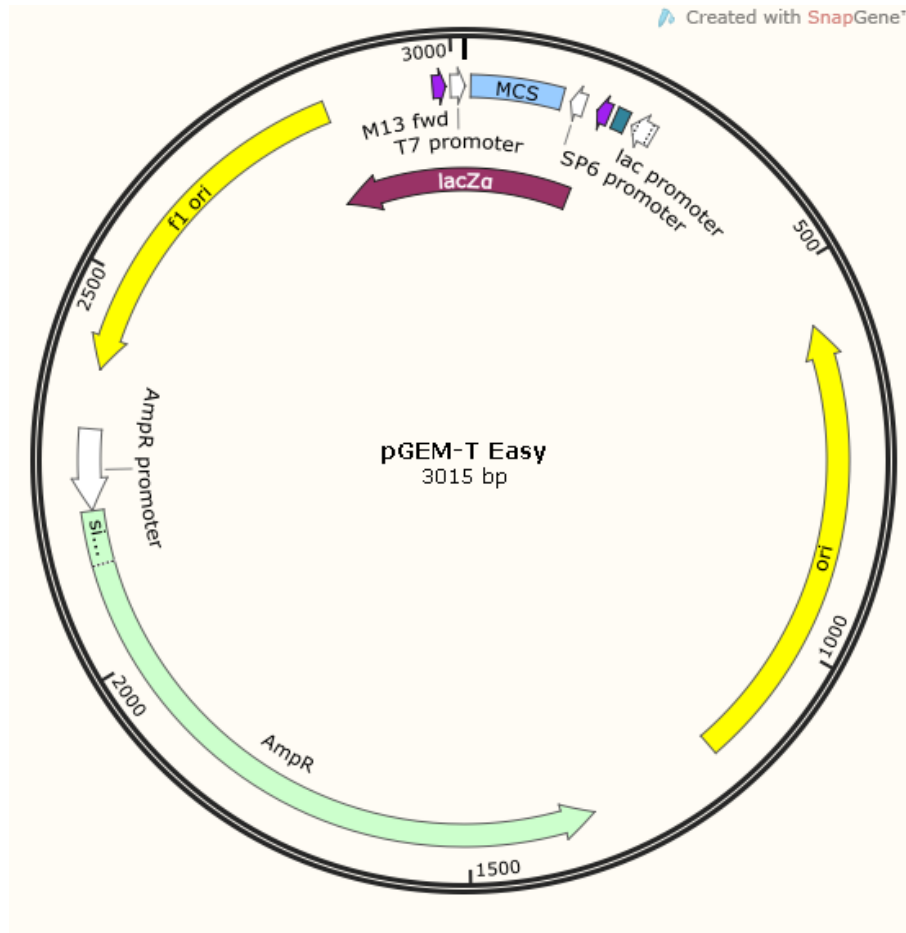


Figura 6. Vector pGEM-T-Easy. Este vector permite la clonación de productos de PCR, por el uso de la Taq DNA polimerasa Platinum™. El vector cuenta con un gen de resistencia a ampicilina.

9.7 Construcción del vector suicida pJMS-FAB

El vector pGEM-FA se digirió con enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*, que liberan el fragmento A, el cual fue subclonado en el vector pJMS-Km (Figura 7), digerido con las mismas enzimas, posteriormente se ligó con la enzima T4 DNA ligasa. Una vez obtenido el vector se transformó en *E. coli* DH5α, se seleccionó y se comprobó por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391FA) y restricción. Una vez comprobado este vector se denominó “pJMS-FA”.

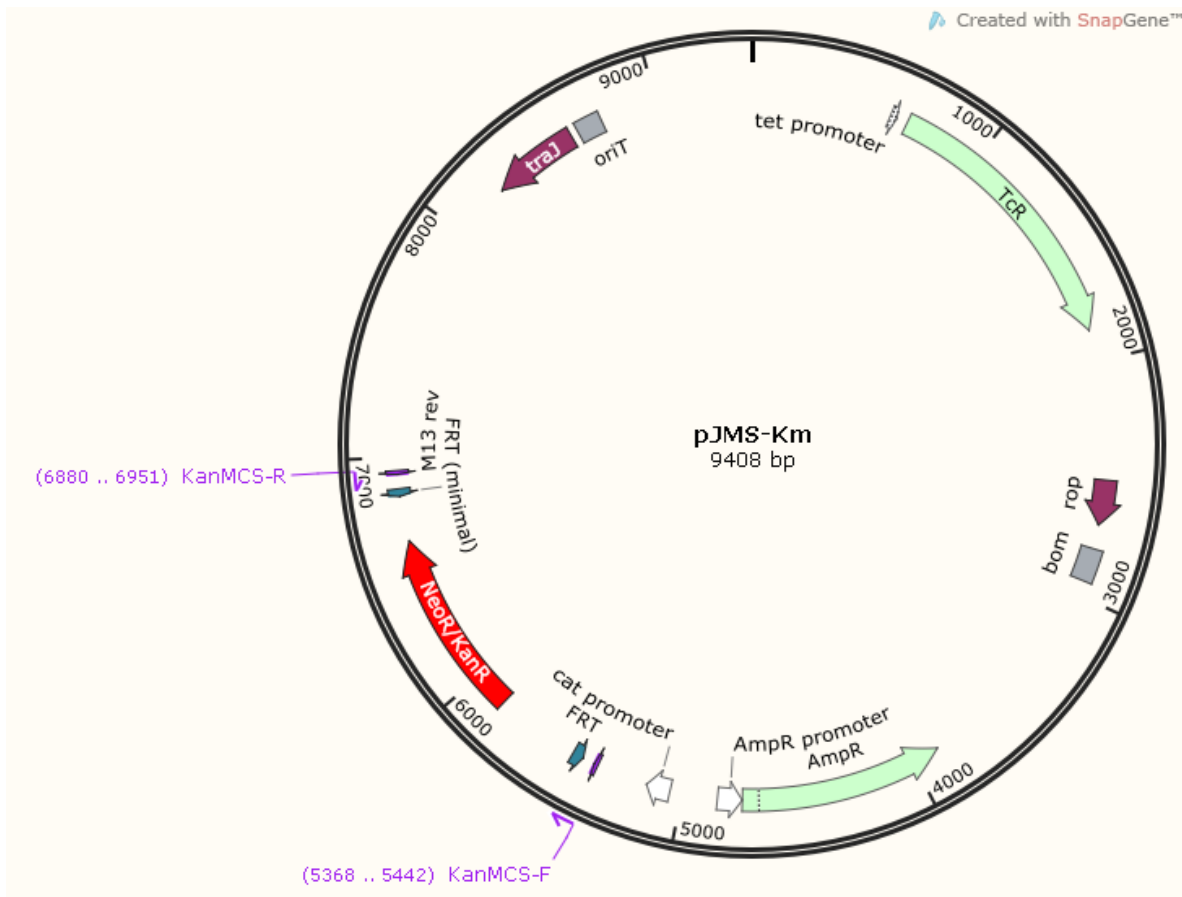


Figura 7. Vector pJMS-Km . Vector suicida, empleado para la generación del plásmido mutagénico del gen *cdgF*.

Se liberó el fragmento B al digerir pGEM-FB con las enzimas de restricción *SacI* y *SpeI*, y se clonó en el vector pJMS-FA ya digerido con las mismas enzimas, se ligó y se transformó en *E. coli* DH5 α , se seleccionó y se comprobó que esta construcción tuviera ambos fragmentos A y B, por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RB) y restricción. Además se corroboró por secuenciación del fragmento A utilizando los iniciadores AB40391FA y AB40391RA y del fragmento B usando los iniciadores AB40391FB y AB40391RB, ambos a partir del vector suicida pJMS-FAB40391.

9.8 Obtención y comprobación de la mutante $\Delta cdgF$

Una vez obtenido el vector pJMS-FAB se transformó en la cepa donadora *E. coli* S17.1, se seleccionaron las clonas adecuadas y se comprobaron por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RB), esta cepa fue la que se utilizó para realizar la conjugación biparental bacteriana junto con *A. brasilense* Sp245 (cepa receptora) generando la cepa mutante *A. brasilense* 40391. Esta cepa se seleccionó con kanamicina y se contraseleccionó con tetraciclina, se comprobó por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RB).

9.9 Construcción del plásmido integrativo pAZBR-Gm

Se amplificó por PCR el casete de resistencia a gentamicina a partir del vector pBBR1MCS-5 (Ver condiciones en tabla anexo 3), se clonó en el vector pGEM-T-Easy, se transformó en *E. coli* DH5 α y las clonas se seleccionaron con antibióticos de gentamicina y ampicilina, se comprobaron mediante PCR punto final (iniciadores GmFXhoI y GmRSpeI), a este vector se le llamo pGEM-Gm.

Para amplificar el gen *cdgF* con su propia región promotora, se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción *XhoI* y *EcoRI* (ver condiciones en tabla anexo 4). El fragmento amplificado se clonó en el vector de almacenamiento pGEM-T-Easy, se transformó y las clonas seleccionadas se comprobaron por PCR (c-AB40391F y c-AB40391R) y restricción, el vector obtenido se llamó pGEM-cdgF.

Para la construcción del plásmido integrativo se digirió el vector pGEM-Gm y pAZBR-T7-mCherry (Figura 8) con las enzimas de restricción *XhoI* y *SpeI* y se ligaron el casete de gentamicina y el esqueleto del otro vector para obtener pAZBR-Gm. Se transformó en *E. coli* DH5 α , las clonas seleccionadas se comprobaron por PCR y restricción.

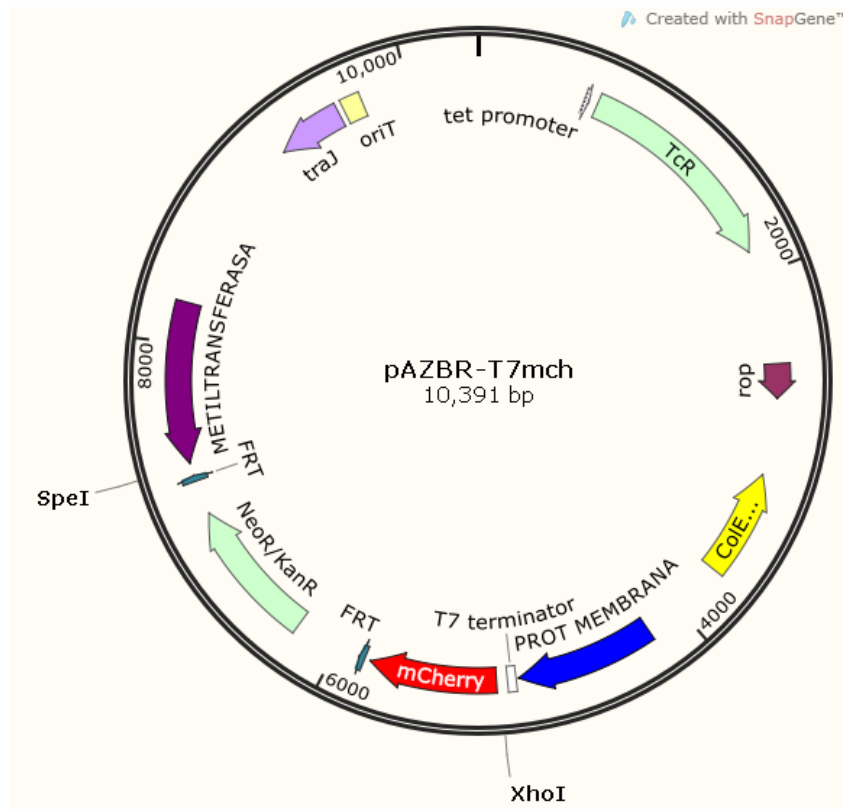


Figura 8. Vector pAZBR-T7-mCherry. Es un vector suicida, empleado para complementación en *cis* de la mutante (Marcos, 2016).

El vector pAZBR-Gm se digirió con enzimas *XhoI* y *EcoRI* para clonar el fragmento *cdgF*, el cual fue liberado del vector pGEM-*cdgF* con las mismas enzimas, ambos fragmentos se ligaron, el producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5 α y se comprobó por PCR y restricción. A este vector se le denominó pAZBR-*cdgF*.

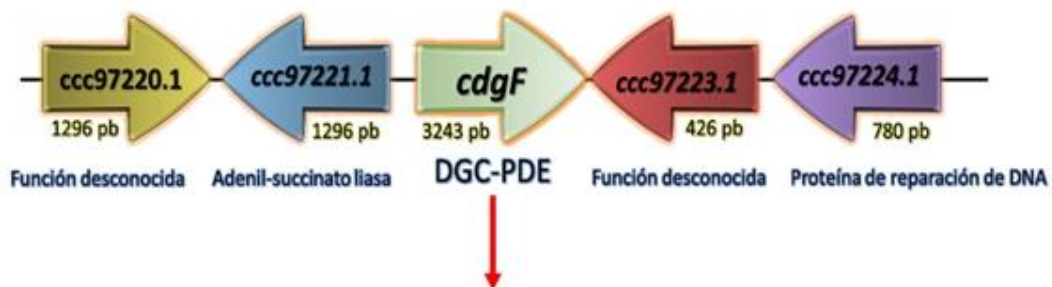
El vector pAZBR-Gm se transformó en la cepa donadora *E. coli* S17.1, las cepas seleccionadas se comprobaron por PCR. *E. coli* S17.1 con el vector pAZBR-Gm (cepa donadora) se usó para la conjugación biparental junto con *A. brasilense* 40391 (cepa receptora) para generar la cepa *A. brasilense* 40392. Para la obtención de la cepa complementada se transformó el vector pAZBR-*cdgF* en *E. coli* S17.1 (cepa donadora) y se conjugó con *A. brasilense* 40391 (cepa receptora) para generar la cepa complementada (*A. brasilense* 403913). Las cepas se seleccionaron con gentamicina y se contraseleccionaron con tetraciclina y se comprobaron por PCR punto final (iniciadores MP-*PstI*F y MTF-*NcoI*R).

10. RESULTADOS BIOINFORMATICOS

10.1 ANALISIS BIOINFORMÁTICOS

Se dio a la tarea de conocer el contexto genético del gen *cdgF* analizando la base de datos (GeneBank). Además, se utilizó el programa SmartProtein para generar un diagrama de los dominios de la proteína CdgF. El gen *cdgF* se encuentra codificado en el cromosoma de *A. brasilense* Sp245, anotado en el GeneBank con el número de acceso *ccc97222.1* (URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=13107709>). Su contexto genético está compuesto por un gen que codifica para una adenilsuccinato liasa y un gen de función desconocida, mientras que abajo se localizan un gen de función desconocida y un gen que codifica para una proteína de reparación de DNA. El gen *cdgF* tiene un tamaño de 3243 pb (Figura 9A) y codifica para una proteína multidominio de 1080 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 121.254 KDa, con probables funciones de diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa dado que contiene un dominio catalítico GGDEF y un dominio catalítico EAL, dos dominios de señalización CACHE, dos regiones transmembranales, y dos dominios de señalización PAS (Figura 9B). En la tabla 5 se muestra la longitud de los residuos aminoacídicos que conforman a cada dominio.

A)



B)



Figura 9. A) Diagrama del contexto genético del gen *cdgF*. B) Diagrama de la proteína CdgF mostrando sus dominios.

Tabla 5. Residuos de aminoácidos de los dominios de CdgF.

Dominio	Residuos de aminoácidos
Péptido señal	1 – 30
Primer dominio transmembranal	32 – 46
Primer dominio CACHE	86 – 180
Segundo dominio CACHE	226 – 239
Segundo dominio transmembranal	382 – 400
Primer dominio PAS	414 – 515
Segundo dominio PAS	523 – 637
Dominio GGDEF	637 – 809
Dominio EAL	819 – 1064

10.1.1. Modelado por homología de la proteína CdgF.

Para confirmar la presencia de los dominios y predecir su probable función de DGC y/o PDE, nos dimos a la tarea de generar modelos estructurales tridimensionales por homología de la proteína de cada uno de los dominios que conforman a CdgF. Estos modelos permitieron inferir la estructura terciaria de los dominios sensores (CACHE y PAS) como un primer acercamiento, para conocer a los probables ligandos que pueden unir o detectar.

Para conocer la estructura terciaria de cada uno de los dominios que forman parte de la proteína CdgF, se utilizaron los programas: I-Tasser y Swiss-Model. Se predijo dicha estructura por homología usando estructuras cristalográficas reportadas a la fecha de este tipo de dominios, tomando en consideración el porcentaje de identidad (> 20%), C-score (~-2.0), TM-score (~ 0.5-1.0) y RMSD (< 3.5 Å).

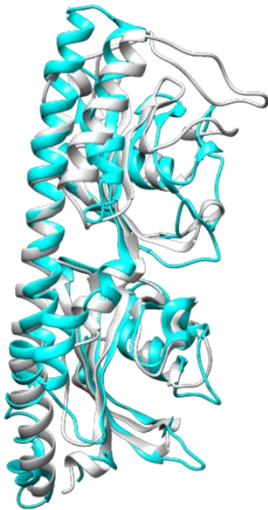
10.1.2. Modelado de los dominios CACHE de la proteína CdgF.

El dominio CACHE de CdgF de *A. brasilense* sp245 es de tipo dCACHE_2 (Upadhyay, *et al.*, 2016). Para predecir la estructura tridimensional que estos dominios conforman, se sometieron a modelado por homología ambos dominios CACHE en conjunto. Ambos programas nos arrojaron al dominio dCACHE_2 de la proteína 6MNI con scores dentro de los parámetros confiables. Tal dominio forma parte de una proteína aceptora de grupos metilo (MCP, por sus siglas en inglés Methyl Accepting Protein) recientemente cristalizada de *Pseudomonas syringae*, el cristal fue obtenido por cristalografía de rayos X, con una resolución de 1.69 Å y

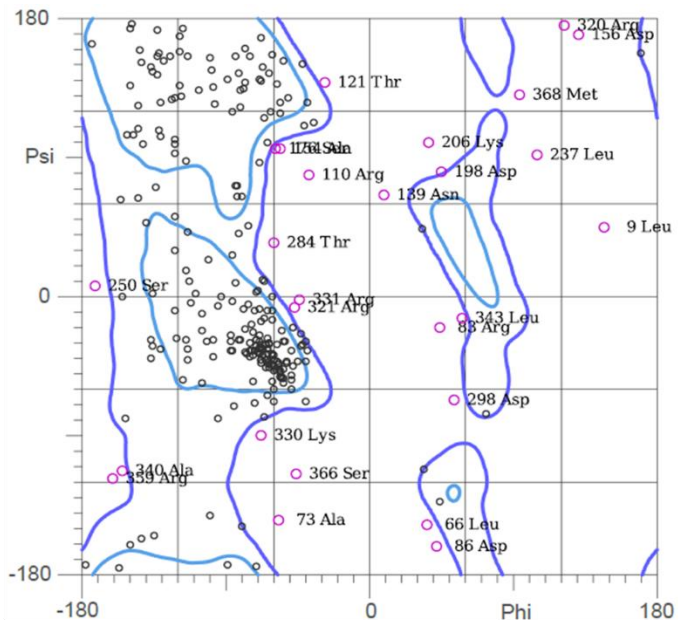
depositada en la base de datos Protein Data Bank (PDB) con el nombre de 6MNI (URL:<https://www.rcsb.org/structure/6MNI>). La plataforma I-Tasser arrojó los siguientes valores: C-score de -1.34, TM-score (0.704) y RMSD (2.94 Å). De acuerdo con estos valores este modelo podría ser confiable (figura 10). Adicionalmente, el programa Molprobit (URL:<http://molprobit.biochem.duke.edu/>) indicó que 67.80 % de todos los aminoácidos se encuentran en regiones favorables, y el 86.60% de todos los residuos se encuentran en regiones permitidas, gráfico de Ramachandran. Estos datos proponen que la estructura terciaria del dominio dCACHE_2 está conservada, no obstante, el porcentaje de identidad (Idem) es baja en la secuencia de aminoácidos (17.03 %).

• Alineamiento

A



D



• Dominio CACHE de DgcF

B



- C-score: -1.34
- Tm- Score: 0.704
- RMSD: 2.94 Å

• Dominio CACHE de 6MNI

C



Pseudomonas syringae

Figura 10. Modelo dCACHE_2 de la proteína CdgF. **A.** Alineamiento del dominio CACHE de CdgF de *A. brasilense* con CACHE de 6MNI de *P. syringae*. **B.** Dominio CACHE de CdgF de *A. brasilense*. **C.** Dominio CACHE de 6MNI de *P. syringae*. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera. **D.** Gráfico de Ramachandran del dominio dCACHE_2 de DgcF.

En la figura 11 se observan las estructuras secundarias que conforman a los dominios dCACHE_1 de TlpC de *Helicobacter pylori* y al dominio dCache_2 de CdgF de *A. brasilense*, en donde las características importantes son la presencia de una alfa-hélice larga N-terminal, un CACHE distal constituido por 2 alfa hélices y 6 hojas beta-plegadas, un dominio CACHE proximal formado por 4 alfa hélices y 5 beta-plegadas, cabe mencionar que la estructura de los doble CACHE pueden tener

diferencias en la cantidad de alfa hélices y hojas beta, lo cual hace que se distingan entre los diferentes tipos de dominios CACHE.

La proteína TlpC de *H. pylori* contiene un dominio extracitoplasmático de doble CACHE de unión a ligando que puede detectar lactato para favorecer la quimiotaxis. La estructura secundaria de este dominio muestra características estructurales secundarias importantes para poder definir a un dominio dCACHE_1, el cual consta de una alfa-hélice larga N-terminal, un CACHE distal constituido por dos alfa-hélices y 6 hojas beta-plegada, un CACHE proximal constituido por cuatro alfa-hélices y 5 hojas betas plegadas (Ver figura 11).

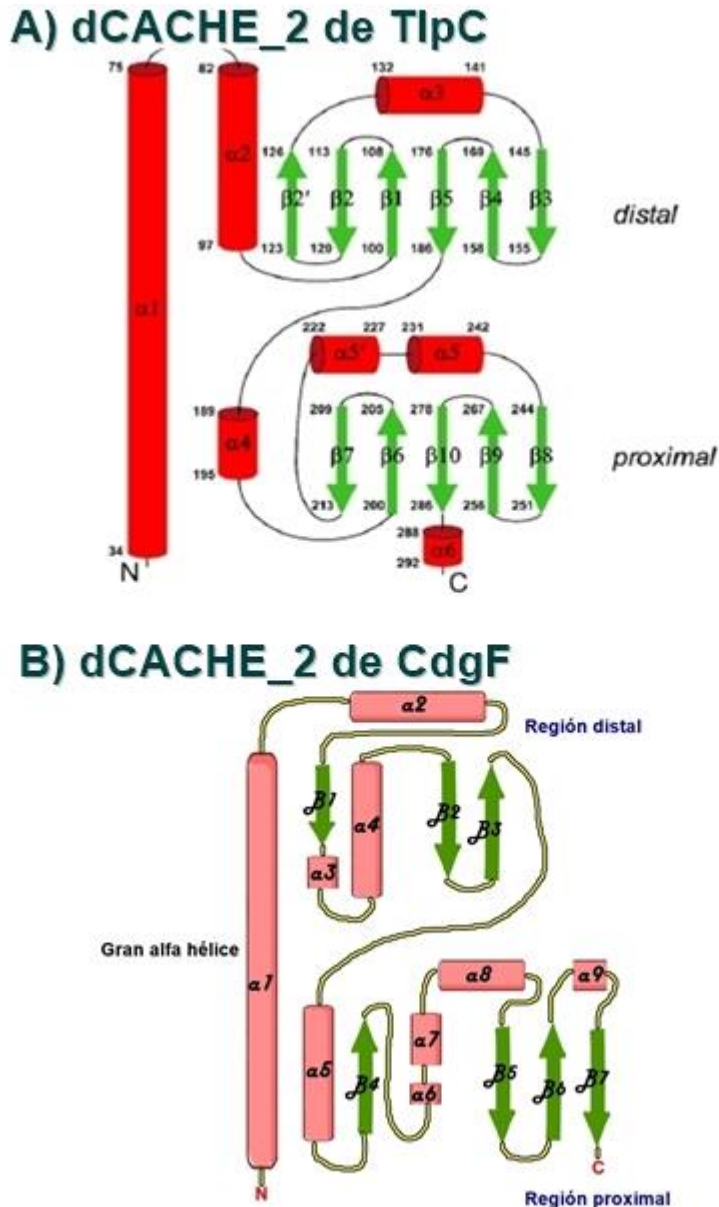


Figura 11. **A.** Estructura secundaria del dominio dCACHE_1 de la proteína TlpC. **B.** Estructura terciaria del dominio dCACHE_2 de la proteína CdgF.

Cabe mencionar que los ligandos mostrados en la figura 12 corresponden a los proporcionados por el programa COFACTOR, en donde se muestran aquellos ligandos que probablemente podrían interactuar con el dominio dCACHE_2 de CdgF de *A. brasilense* Sp245, siendo el de mejor score el de Urea. Al realizar alineamientos del dominio dCACHE_2 de CdgF con el dominio dCACHE_1 de TlpC, se observa que los aminoácidos de dCACHE_2 con los que esta interactuando con los ligandos no están conservados en el dominio dCACHE_1. Debido a que ambos

dominios tanto dCACHE_2 como dCACHE_1 son distintos en estructura y secuencia de aminoácidos, los ligandos que podrían detectar son distintos, así como los aminoácidos involucrados en la detección. Existe información disponible de ligandos detectados por dominios dCACHE_1, sin embargo hay poca información sobre los dominios dCACHE_2 (Upadhyay, *et al.*, 2016).

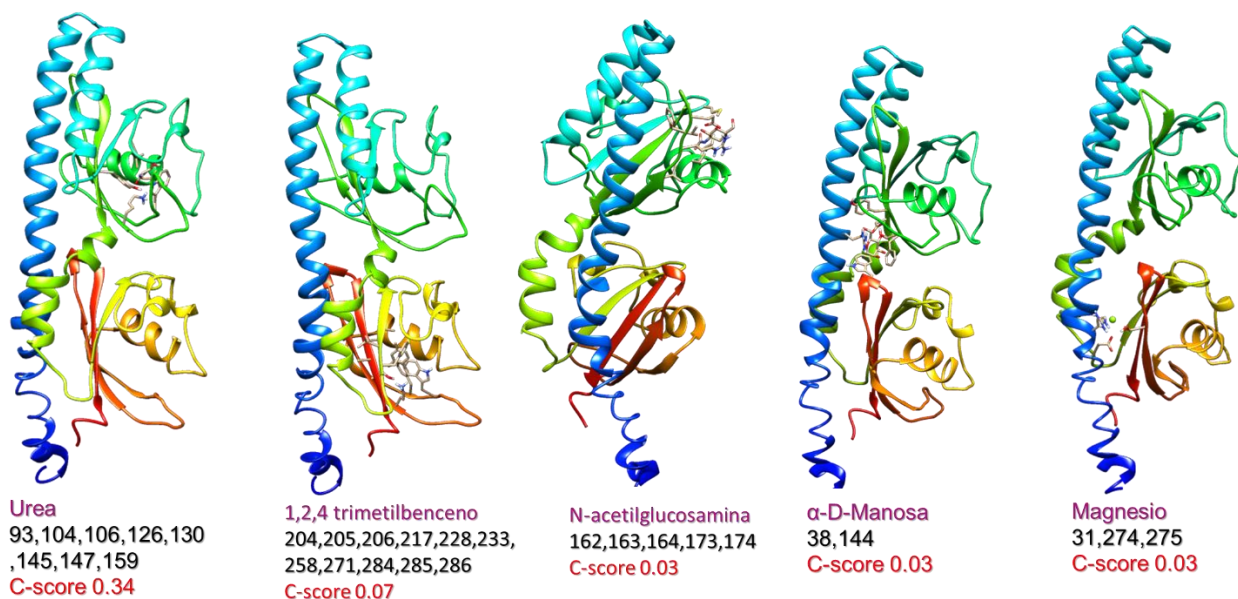


Figura 12. Posibles ligandos del dominio dCACHE_2 de la proteína CdgF. En morado se observa el nombre del ligando, el número en negro indica la posición de los aminoácidos involucrados en la interacción ligando-proteína, en rojo se muestra el C-score de cada ligando. Datos obtenidos del programa COFACTOR. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera.

De acuerdo con estos datos, se podría especular que cualquiera de estos ligandos (Urea, Trimetilbenceno, N-acetilglucosamina, D-Manosa y Magnesio) pudieran ser detectados por el dominio dCACHE_2 de CdgF para promover la activación de los dominios de DGC o PDE.

10.1.3. Modelado de los dominios PAS.

Para conocer la estructura tridimensional que estos dominios conforman, se sometieron a modelado por homología ambos dominios PAS en conjunto. En la figura 13 se muestra la estructura terciaria de los dos dominios PAS de la proteína CdgF obtenida de la plataforma de I-Tasser, el modelo mostró los siguientes valores: C-score (1.06), TM-score (0.851) y RMSD (1.23 Å). De acuerdo a este programa, el modelo obtenido es muy similar al dominio PAS-PAS de 3EWK

(<https://www.rcsb.org/structure/3ewk>) un dominio sensor redox presente en *Methylococcus capsulatus*. El gráfico de Ramachandran obtenido del programa Molprobit indica que 78.30% de todos los aminoácidos de estos dominios se encuentran en regiones favorables, y el 89.40% de todos los aminoácidos se encuentran en regiones permitidas. Adicionalmente, al realizar un alineamiento de la región PAS-PAS de CdgF de *A. brasilense* sp245 y de 3EWK de *Methylococcus capsulatus* se observa una identidad de secuencia de aminoácidos de 33.01 %.

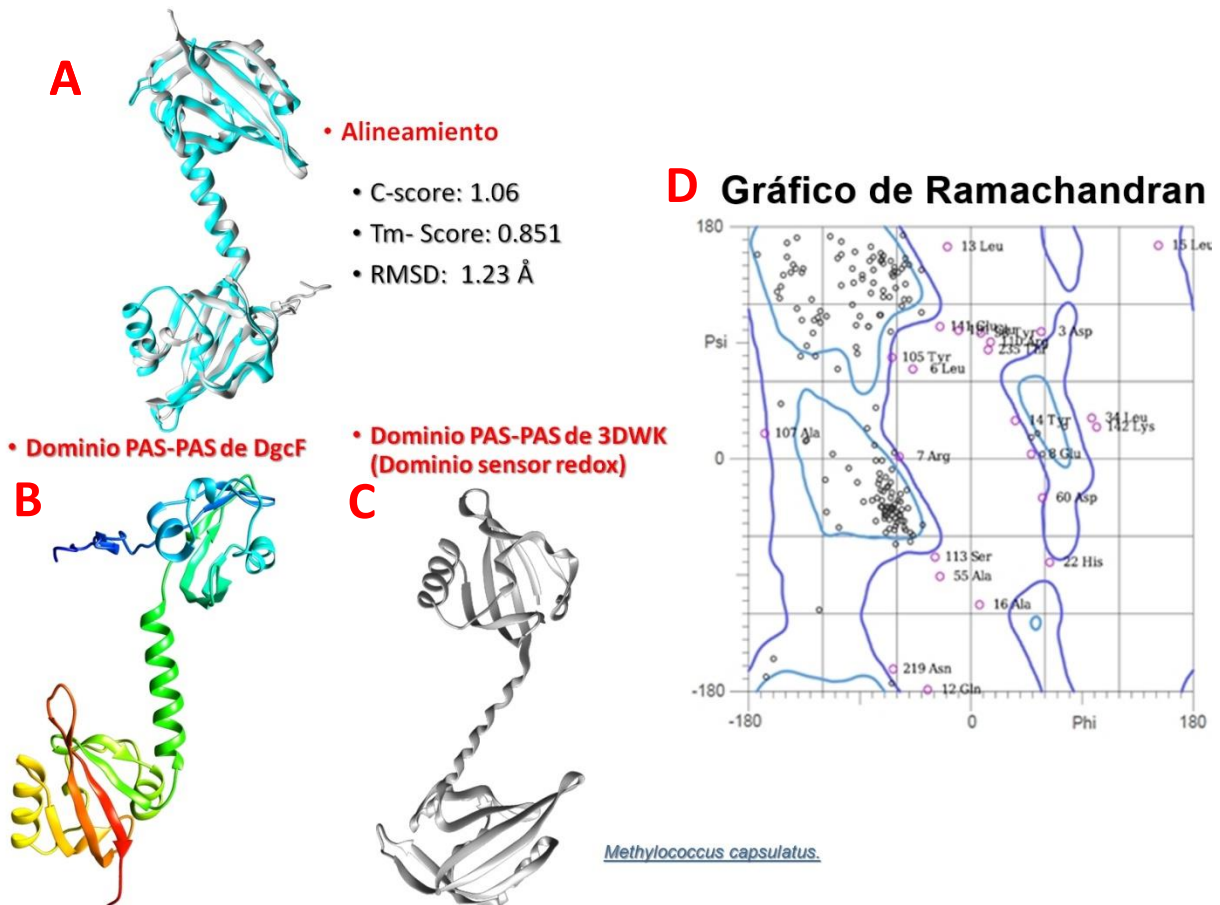


Figura 13. Modelo de los dominios PAS-PAS de la proteína CdgF. A. Alineamiento del dominio PAS-PAS de CdgF de *A. brasilense* con PAS-PAS de 3DWK de *P. syringae*. **B.** Dominio PAS-PAS de CdgF de *A. brasilense*. **C.** Dominio PAS-PAS de 3DWK de *P. syringae*. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera. **D.** Gráfico de Ramachandran del dominio PAS-PAS de DgcF.

Para conocer los posibles ligandos con los que interactúan los dominios PAS de CdgF se sometieron a análisis en el programa COFACTOR. En la figura 14 se observan los posibles ligandos proporcionados en el análisis anterior con los que pueden interactuar los dominios PAS, siendo el mejor el Flavin MonoNucleótido. Con base en los estudios realizados por Salazar en 2017, se confirmó que el FAD

puede incrementar hasta tres veces la actividad de fosfodiesterasa al realizar ensayos enzimáticos de fosfodiesterasa.

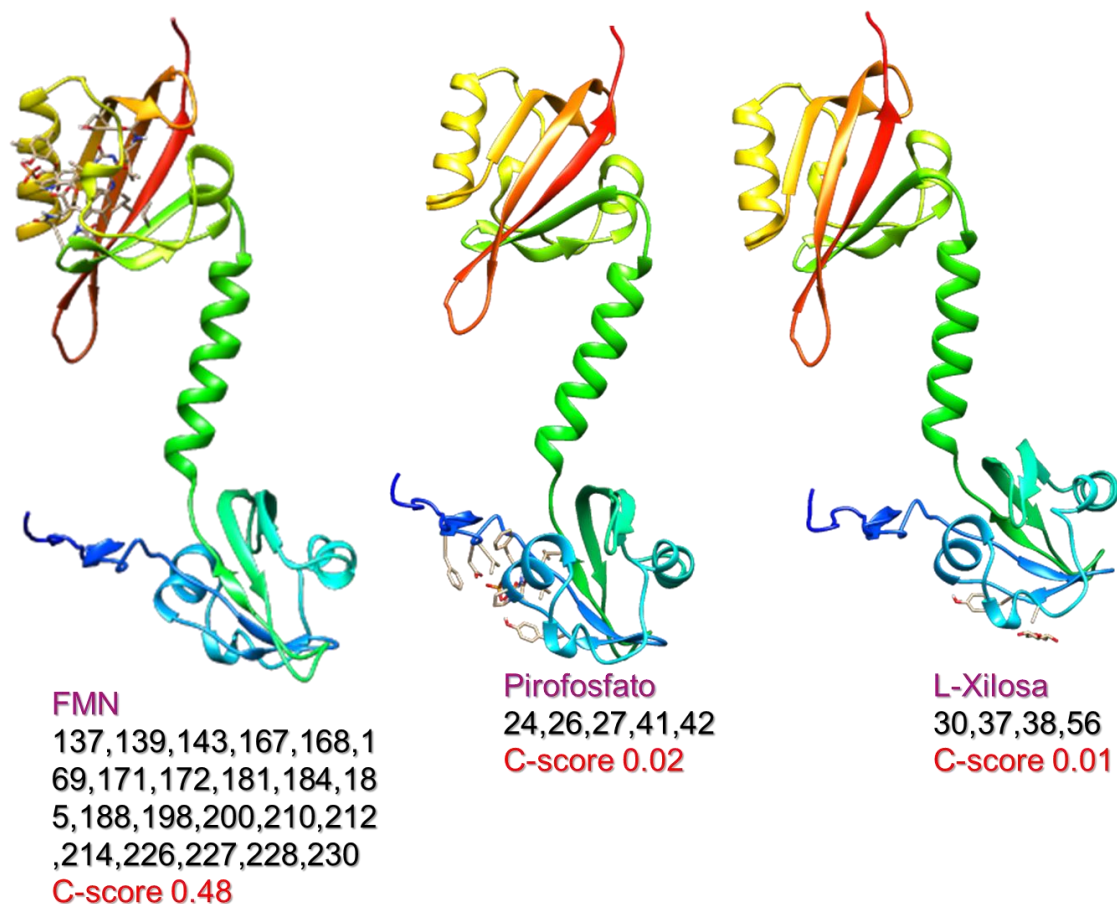


Figura 14. Ligandos de los dominios PAS de la proteína CdgF. En morado se observa el nombre del ligando, el número en negro indica la posición de los aminoácidos involucrados en la interacción ligando-proteína, en rojo se muestra el C-score de cada ligando. Datos obtenidos del programa COFACTOR. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera.

10.1.4. Modelado de los dominios DGC y PDE

Para conocer la estructura tridimensional que estos dominios conforman, se sometieron a modelado por homología ambos dominios DGC-PDE en conjunto. En la figura 15 se muestra el mejor modelo otorgado para ambos dominios DGC-PDE, en donde éste es muy parecido al dominio DGC-PDE de 5M3C (<https://www.rcsb.org/structure/5M3C>) de *P. aeruginosa*. El C-score fue de 0.04, TM-score de 0.850 y RMSD de 2.49 Å, indicando que el modelo podría ser confiable. El gráfico de Ramachandran indicó que el 87.10% de todos los aminoácidos se

encontraron en regiones favorables en la conformación geométrica y el 95.20% se encontraron en regiones permitidas. Al realizar un alineamiento entre la región DGC-PDE de CdgF y de 5M3C de *P. aeruginosa* se obtiene un porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos de 45.60 %.

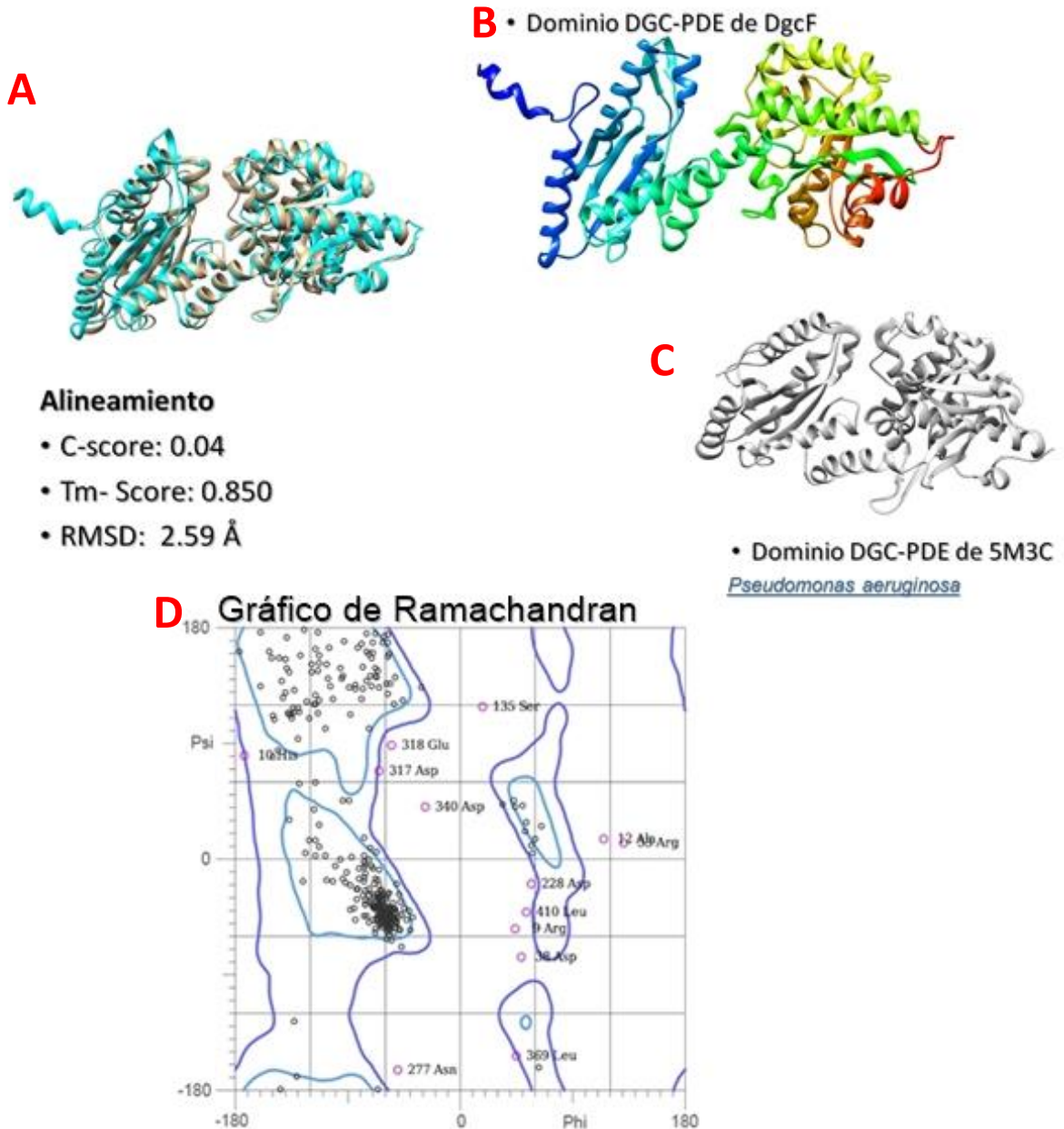


Figura 15. Modelado por homología de los dominios DGC-PDE de la proteína CdgF. A. Alineamiento del dominio DGC-PDE de CdgF de *A. brasilense* con DGC-PDE de 5M3C de *P. aeruginosa*. **B.** Dominio DGC-PDE de CdgF de *A. brasilense*. **C.** Dominio DGC-PDE de 5M3C de *P. aeruginosa*. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera. **D.** Gráfico de Ramachandran del dominio DGC-PDE de **CdgF**.

Para conocer los posibles ligandos con los que interactúan los dominios DGC-PDE de CdgF, se sometieron a análisis en el programa COFACTOR. En la figura 16 se muestran los posibles ligandos con los que podrían estar interactuando los dominios DGC-PDE, siendo el mejor el di-GMP-c.

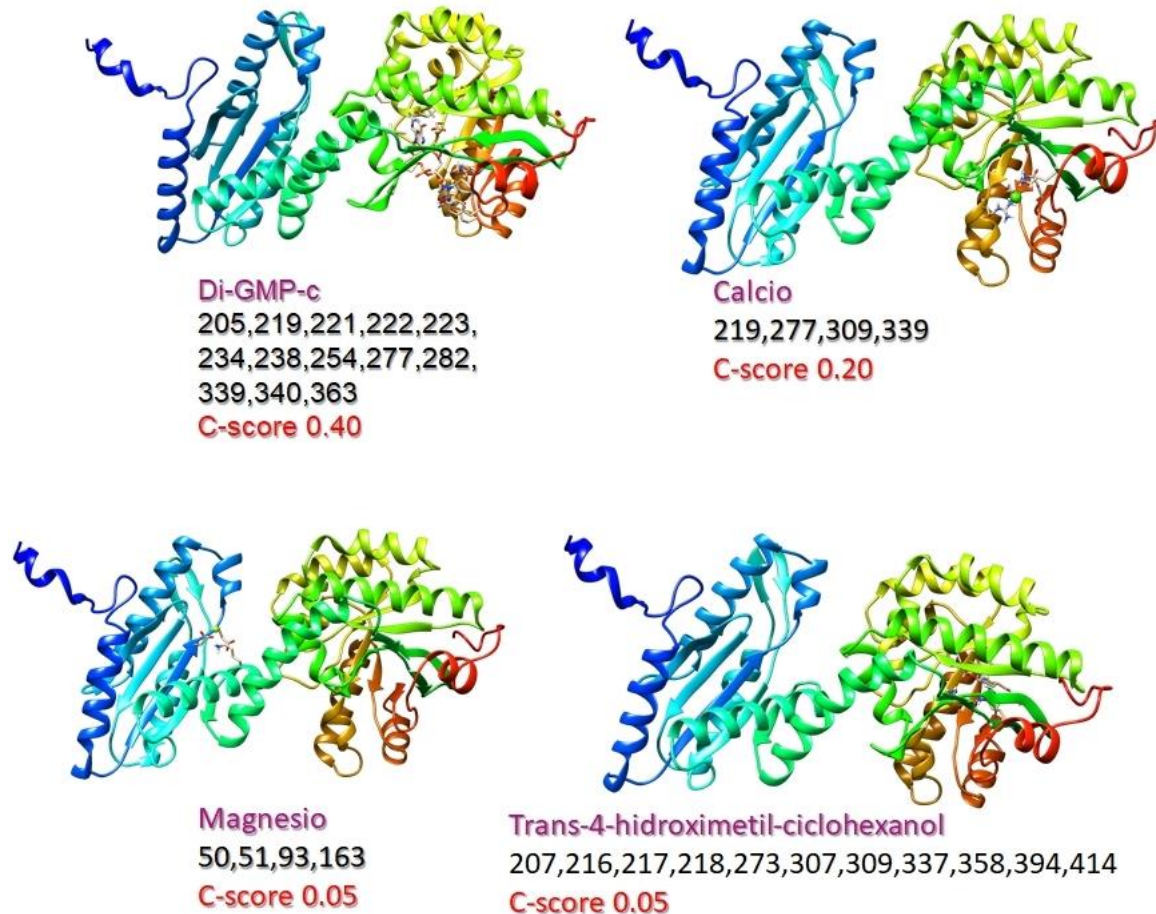


Figura 16. Ligandos de los dominios DGC-PDE de la proteína CdgF. En morado se observa el nombre del ligando, el número en negro indica la posición de los aminoácidos involucrados en la interacción ligando-proteína, en rojo se muestra el C-score de cada ligando. Datos obtenidos del programa COFACTOR. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera.

Con los datos obtenidos por los análisis bioinformáticos realizados se propone el modelo tridimensional descrito en figura 17, donde se observa a la proteína CdgF anclada a la membrana citoplasmática. Debido a que aún no está reportado un cristal que contenga todos los dominios presentes en CdgF, se realizó un modelado por homología en tres secciones (dominios CACHE, dominios PAS y dominios DGC-PDE) para generar el modelo de la figura 17.

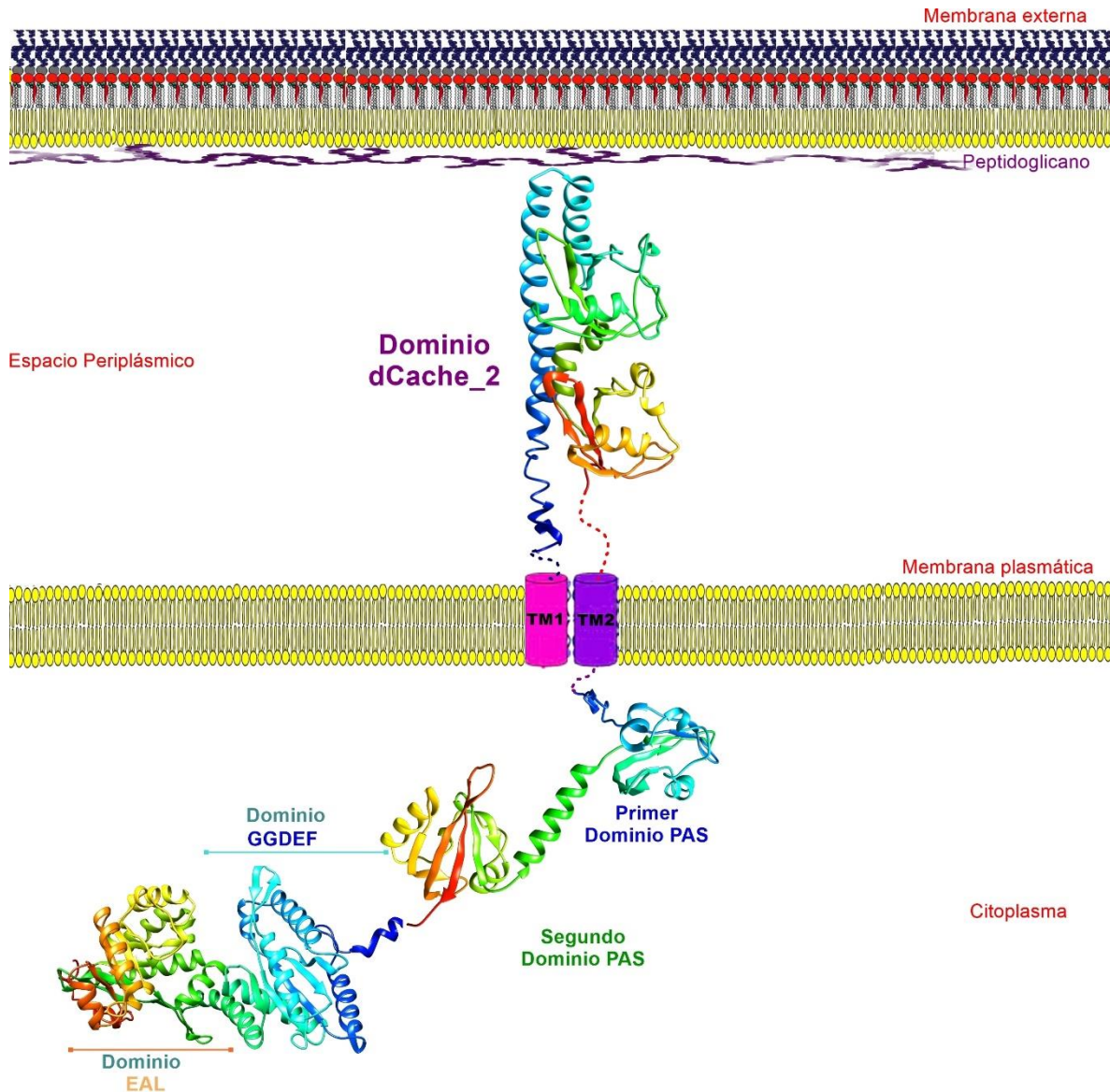


Figura 17. Modelo propuesto de la proteína CdgF mediante Chimera e I-Tasser. Las representaciones tridimensionales de estos modelos se realizaron en Chimera.

Con estos estudios bioinformáticos es interesante especular como podrían activarse los dominios de señalización para que a su vez activarían a los dominios de DGC o PDE y pueda observarse las actividades de DGC o PDE. Por lo que nos pareció relevante realizar una estrategia metodológica adicional que nos permitiera evaluar el efecto del gen en *A. brasilense* Sp245, en la fisiología de la bacteria.

11. RESULTADOS EXPERIMENTALES

11.1. Obtención del plásmido mutagénico pJMS-FAB40391

Para obtener la cepa mutante se siguió la estrategia de reemplazo alélico. Se amplificaron dos fragmentos de las regiones aledañas al gen *cdgF*, estos fragmentos fueron denominados A y B, posteriormente se clonaron en un vector de almacenamiento (pGEM-T-Easy) y finalmente se subclonaron en el vector suicida (pJMS-Km) para obtener el plásmido mutagénico pJMS-FAB0391.

11.2. Amplificación de los fragmentos A y B.

Se realizó la amplificación de los dos fragmentos flanqueantes al gen *cdgF*. El tamaño del fragmento A fue de 947 pb y el del fragmento B fue de 1047 pb (Figura 18).

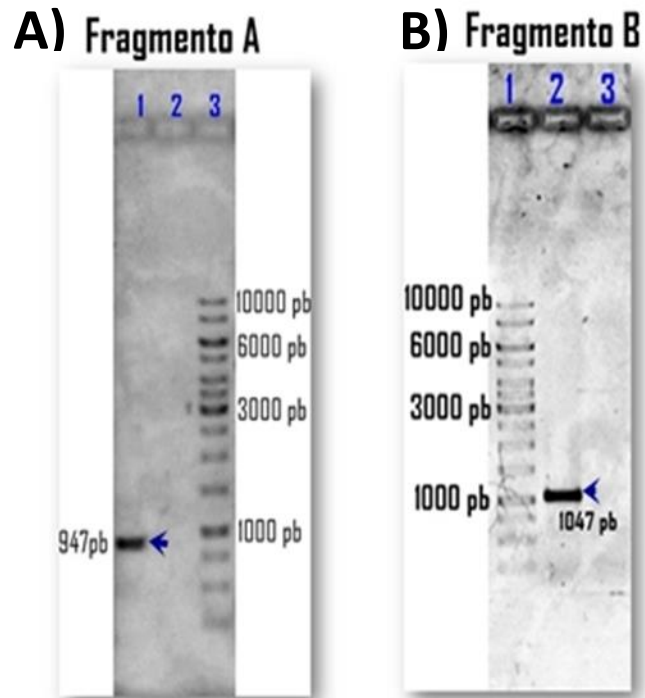


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los productos de PCR de los fragmentos amplificados A y B. A: Fragmento A. Carril 1: producto de PCR de 947 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **B:** Fragmento B. Carril 1: MPM de 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR de 1047 pb marcado con flecha azul. Carril 3: Control negativo.

11.3. Clonación de los fragmentos A y B de las regiones aledañas al gen *cdgF* en el vector de almacenamiento

El fragmento A y el fragmento B se clonaron cada uno por separado en el vector de almacenamiento pGEM-T-Easy. Una vez clonado el fragmento A se seleccionó la clona 4 de *E. coli* DH5 α pGEM-FA, la cual se comprobó por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RA) y restricción con enzimas de restricción *Xho*I y *Kpn*I (Figura 19).

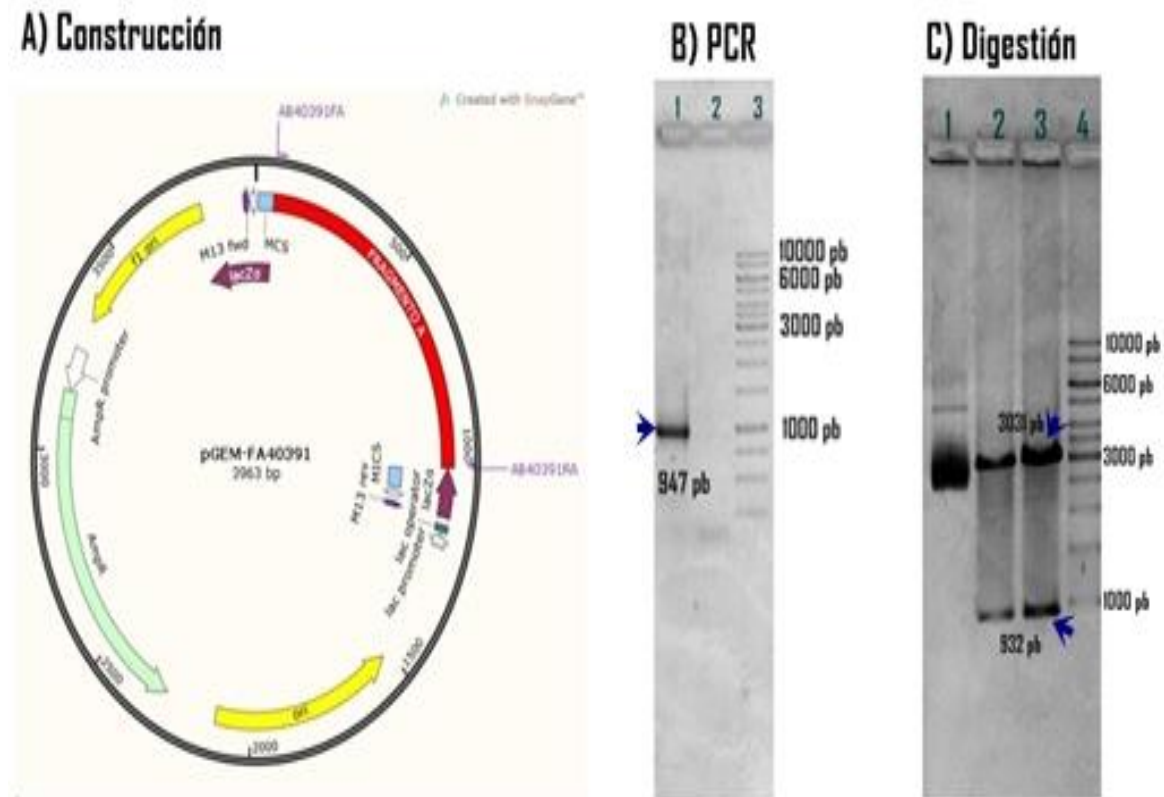


Figura 19. Construcción pGEM-FA40391. **A)** Mapa de pGEM-FA40391. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR de 947 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzimas *Xho*I y *Kpn*I. Carril 1: DNA de la construcción pGEM-FA40391 sin digerir. Carril 2 y 3: DNA de la construcción pGEM-FA40391 digerido con *Xho*I y *Kpn*I (se observan dos productos de restricción: 3031 pb y 932 pb marcados con flecha azul). Carril 4. Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

Para el fragmento B, la clona 4 de *E. coli* DH5 α pGEM-FB40391 fue seleccionada y comprobada por PCR (iniciadores AB40391FB y AB40391RB) y por restricción (Figura 20).

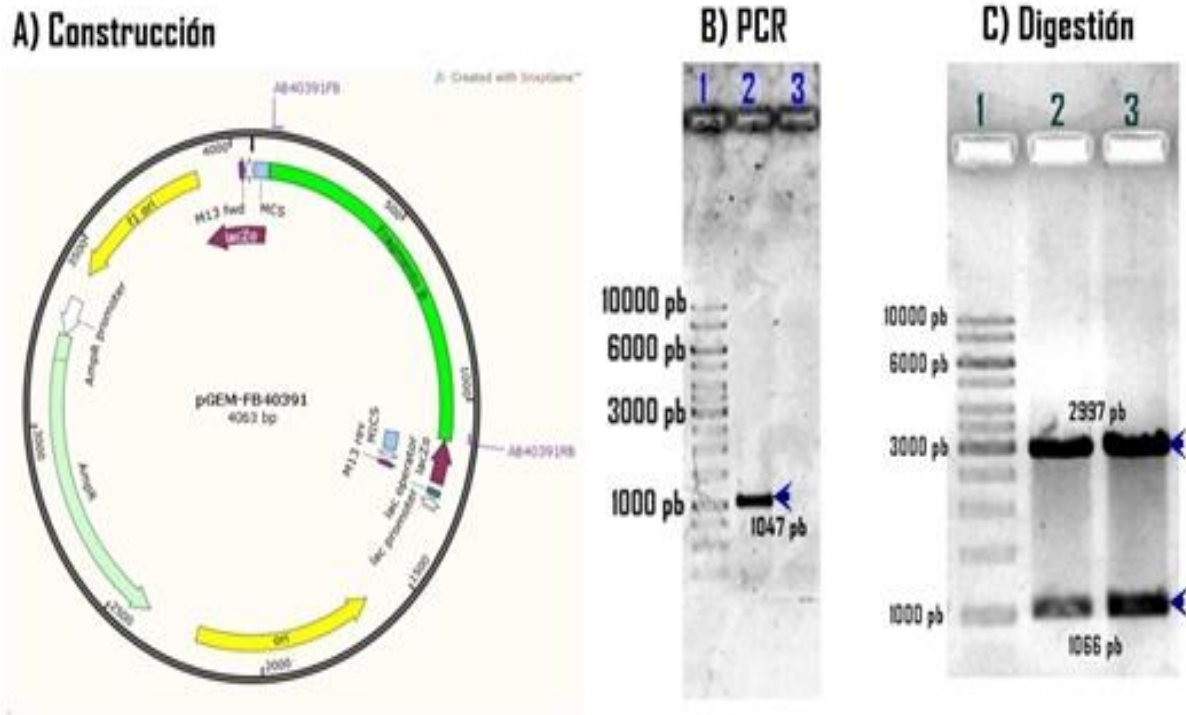


Figura 20. Construcción pGEM-FB40391. **A)** Mapa de pGEM-FB40391. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR de 1047 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzimas *SacI* y *SpeI*. Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2 y 3: DNA de la construcción pGEM-FB40391 digerido con *SacI* y *SpeI* (se observan dos productos de restricción de 2997 pb y 1066 pb marcados con flecha azul).

11.4. Subclonación de los fragmentos A y B en el vector pJMS-Km.

Posteriormente se subclonaron del fragmento A liberado de pGEM-FA en el vector suicida pJMS-Km. Se seleccionó la clona 14 de *E. coli* DH5α pJMS-FA y se comprobó por PCR y restricción (Figura 21).

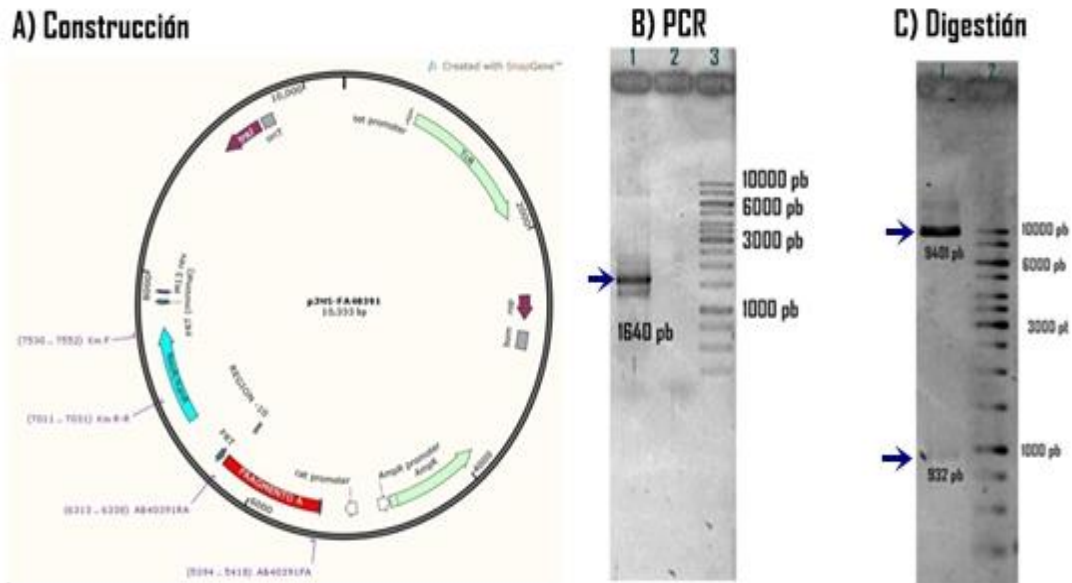


Figura 21. Construcción pJMS-FA40391. **A)** Mapa de pJMS-FA40391. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR de 1640 pb marcado con flecha azul (iniciadores AB40391FA y Km R-R). Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzimas *XhoI* y *KpnI*. Carril 1: DNA de la construcción pJMS-FA40391 digerido con *XhoI* y *KpnI* (se observan dos productos de restricción de 9401 y 932 pb marcados con flecha azul) Carril 2. Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

Una vez comprobado el vector pJMS-FA, se le subclonó el fragmento B. Se seleccionó la clona 5 de *E. coli* DH5 α pJMS-FAB y se comprobó por PCR, digestión (Figura 22) y secuenciación de ambos fragmentos.

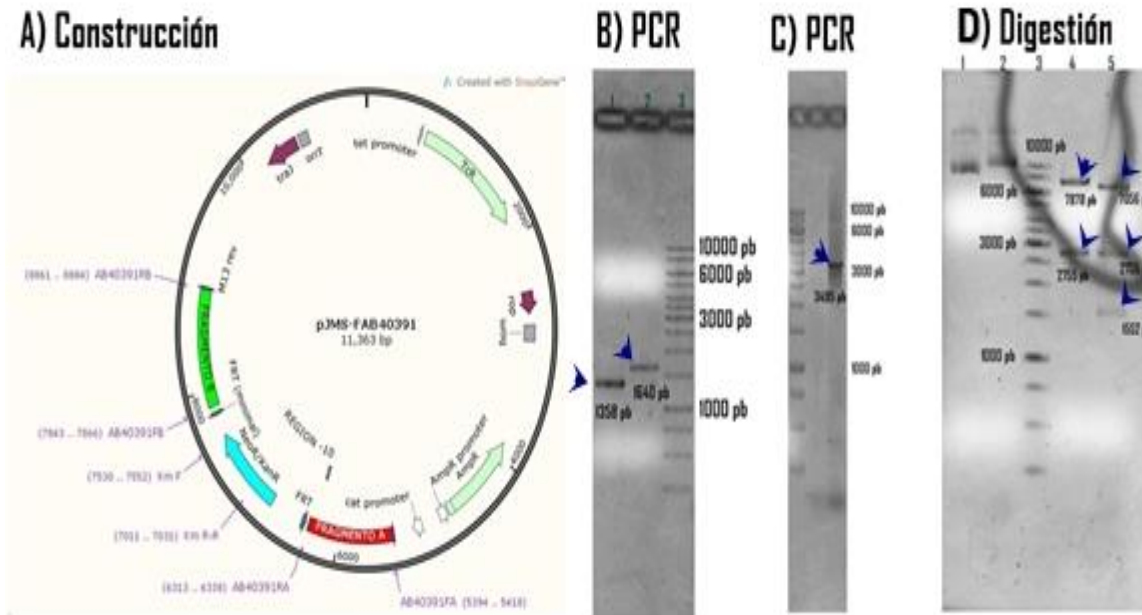


Figura 22. Construcción pJMS-FAB40391. **A)** Mapa de la construcción pJMS-FAB40391. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR de 1358 pb marcado con flecha azul (iniciadores KmF y AB40391RB). Carril 2: producto de PCR de 1640 pb marcado con flecha azul (iniciadores AB40391FA y Km R-R). Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 2: Control negativo. Carril 3: producto de PCR de 3435 pb marcado con flecha azul (iniciadores AB40391FA y AB40391RB). **D)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción. Carril 1: DNA de la construcción pJMS-FA40391 sin digerir. Carril 2: DNA de la construcción pJMS-FAB40391 sin digerir. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 4. DNA de la construcción pJMS-FA40391 digerido con *Pst*I (productos de restricción de 7878 pb y 2755 pb marcados con flecha azul). Carril 5. DNA de la construcción pJMS-FAB40391 digerido con *Pst*I (productos de restricción de 7058 pb, 2755 pb y 1552 pb marcados con flecha azul).

Para confirmar que en el vector pJMS-FAB40391 si tiene las regiones homologas a las regiones aledañas al gen *cdgF* se realizaron los alineamientos de nucleótidos con el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De la secuencia obtenida experimentalmente, de la secuenciación del fragmento A, se obtuvo identidad del 99.76% con la región aledaña al gen *cdgF* (Fragmento A) del cromosoma de *A. brasilense* sp245, se confirma la secuencia esperada del fragmento A, así como el fragmento B, obteniendo una identidad del 99.90% con la otra región aledaña al gen *cdgF* (Fragmento B) del cromosoma de *A. brasilense*. Figuras A2 y A3 del anexo.

11.5. Obtención de la mutante $\Delta cdgF$

11.5.1. Transformación del plásmido mutagénico en la cepa donadora *E. coli* S17.1.

La construcción pJMS-FAB se incorporó en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* S17.1 por transformación, se seleccionó la clona 1, esta se comprobó por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RB) (Figura 23).

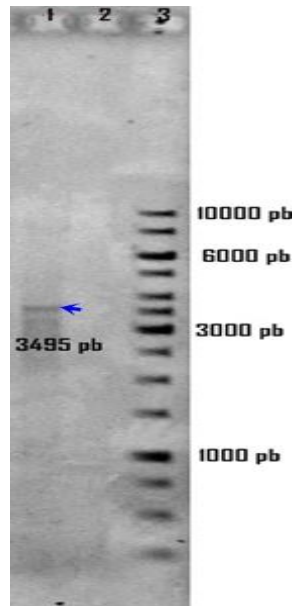


Figura 23. Construcción pJMS-FAB40391 en *E. coli* S17.1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR d 3495 pb marcado con flecha azul (iniciadores AB40391FA y AB40391RB). Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

11.5.2. Conjugación biparental entre *A. brasilense* Sp245 y *E. coli* S17.1

Se realizó una conjugación biparental, las transconjugantes obtenidas se seleccionaron en medio K-lactato con antibiótico Kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se analizaron dos transconjugantes 37 y 42, se corroboraron por PCR (iniciadores AB40391FA y AB40391RB) (Figura 24).

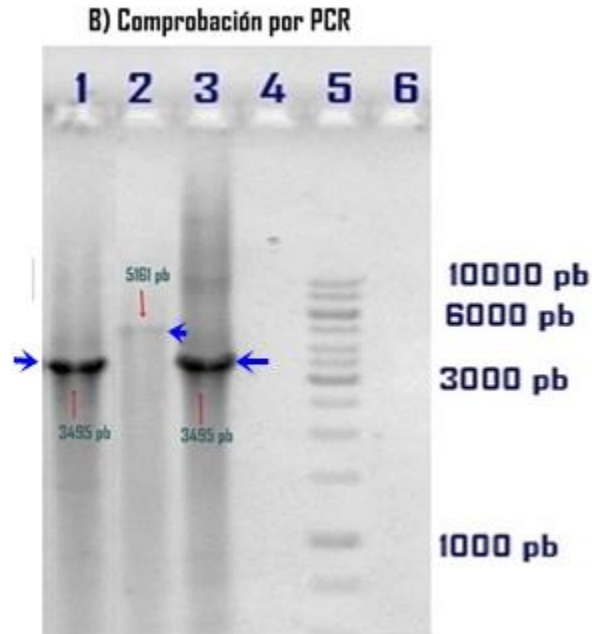


Figura 24. Comprobación de la cepa mutante $\Delta cdgF$ *A. brasilense* 40391. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR usando iniciadores AB40391FA y AB40391RB. Carril 1: producto de PCR de 3495 pb (marcado con flecha azul) del DNA plasmídico de *E. coli* s17.1 pJMS-FAB40391. Carril 2: producto de PCR de 5161 pb (marcado con flecha azul) de DNA genómico de *A. brasilense* Sp245. Carril 3: producto de PCR de 3495 pb (marcado con flecha azul) de DNA genómico de *A. brasilense* 40391 clona 37. Carril 4: Control negativo. Carril 5: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

11.6. Obtención del plásmido integrativo pAZBR-*cdgF*

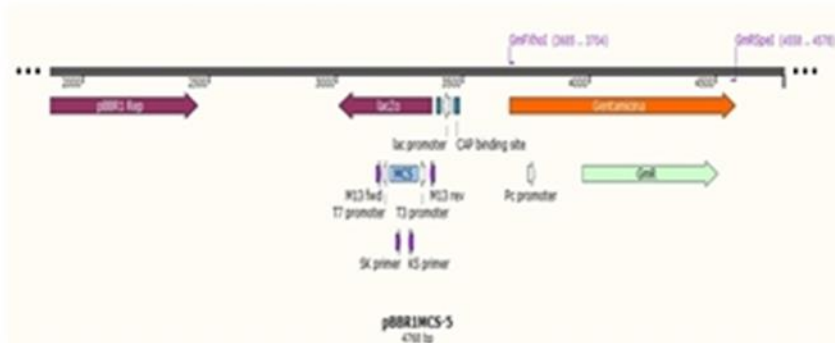
11.6.1. Amplificación del gen *cdgF* con su propia región promotora y del casete de gentamicina.

Para obtener la cepa complementada se siguió la estrategia de reemplazo alélico en un locus neutro, con objetivo de contar con una copia del gen silvestre con el promotor nativo. Se amplificó el gen *cdgF* y la región promotora, y se subclonó en un vector suicida pAZBR-Gm, seleccionaron con el antibiótico de gentamicina.

El vector pAZBR-T7-mCherry fue modificado para la selección de la cepa mutante ya que es resistente a la kanamicina, por lo que optó por sustituir el casete de kanamicina por uno de gentamicina. Posteriormente se subclonó el gen a integrar *cdgF* con su propia región promotora, obteniendo el plásmido integrativo pAZBR-*cdgF*.

Del vector pBBR1MCS-5 se amplificó el casete de gentamicina (figura 25).

A) Casete de gentamicina



B) PCR

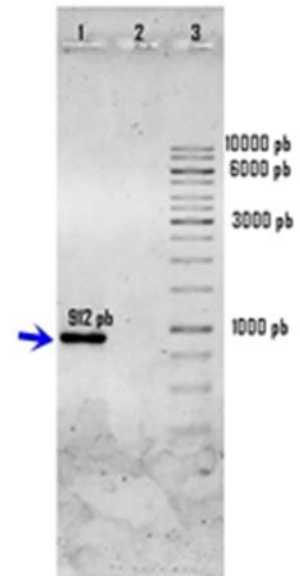


Figura 25. Región a amplificar del casete de gentamicina de pBBR1MCS-5. A) Para la amplificación del casete de gentamicina, se utilizaron los iniciadores GmFXhoI y GmRSpel. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del producto de PCR del fragmento amplificado. Carril 1: producto de PCR de 912 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

Se realizó la amplificación del gen *cdgF* con su región promotora (figura 26).

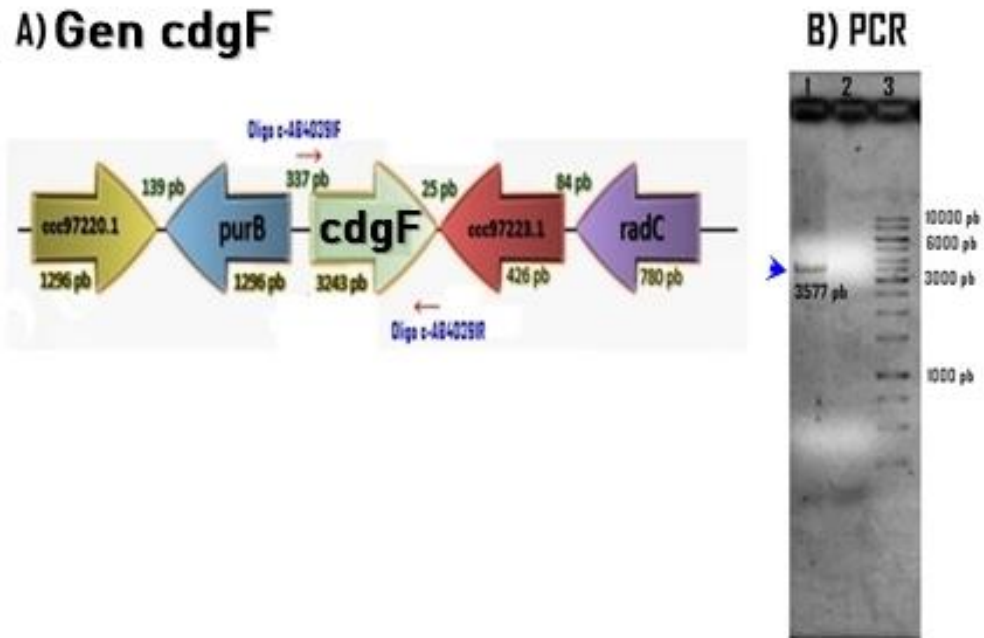
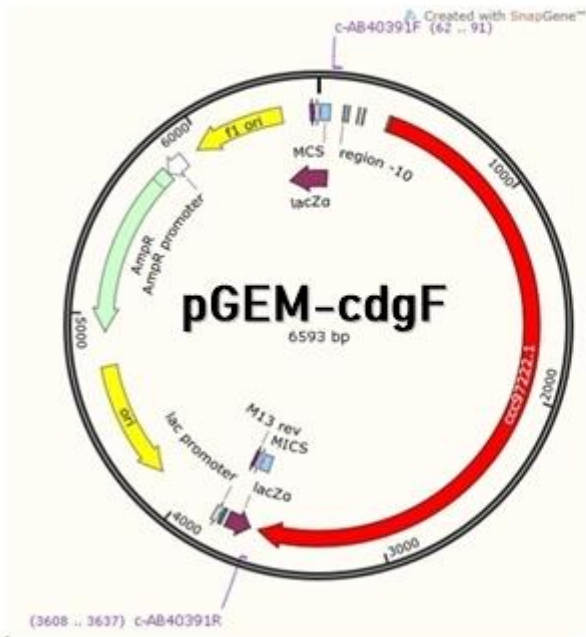


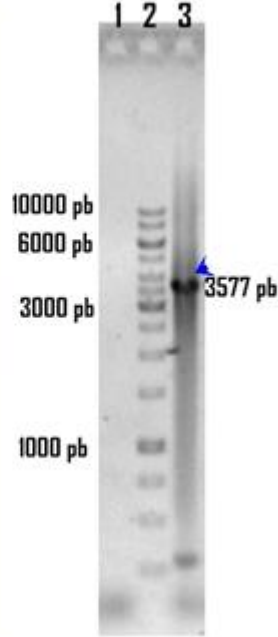
Figura 26. Amplificación del gen *cdgF* con su región promotora. **A)** Para la amplificación del gen *cdgF* con su propia región promotora, se utilizaron los iniciadores c-AB40391F y c-AB40391R. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del producto de PCR del fragmento amplificado. Carril 1: producto de PCR de 3577 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

El gen *cdgF* se clonó en el vector de almacenamiento pGEM-T-easy, se transformó en *E. coli* DH5 α , se seleccionó con ampicilina y se comprobó por PCR y restricción (Figura 27).

A) Construcción



B) PCR



C) Digestión

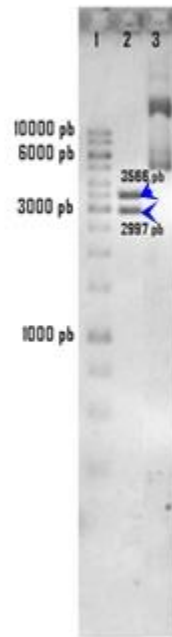


Figura 27. Construcción del plásmido pGEM-cdgF. **A)** Mapa de pGEM-cdgF. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR con iniciadores c-AB40391F y c-AB40391R. Carril 1: Control negativo. Carril 2: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 3: producto de PCR de 3577 pb marcado con flecha azul. **C)** Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzimas *XhoI* y *KpnI*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 2: DNA de la construcción pGEM-cdgF digerido con *XhoI* y *EcoRI* (productos de PCR de 3566 y 2997 pb marcados con flecha azul) Carril 3: DNA de la construcción pGEM-cdgF sin digerir.

Una vez obtenida la construcción pGEM-Gm, se transformó en *E. coli* DH5 α y se seleccionó con gentamicina y ampicilina, se comprobó por PCR y restricción (Figura 28).

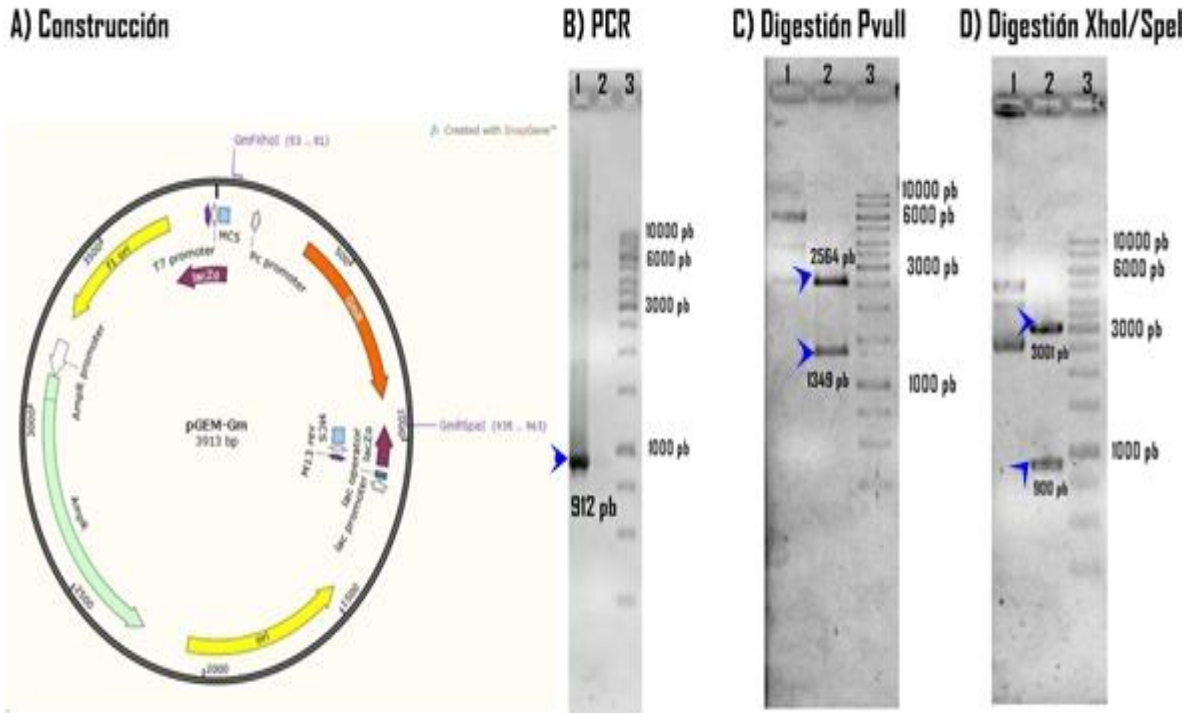
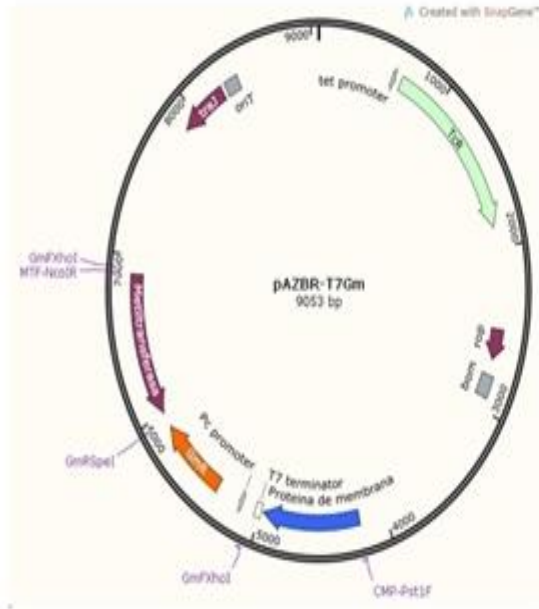


Figura 28. Construcción del plásmido pGEM-Gm. **A)** Mapa de pGEM-Gm. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR. Carril 1: producto de PCR de 912 pb marcado con flecha azul. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Marcador de peso molecular de 1 Kb. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzima *PstI*. Carril 1: DNA de la construcción pGEM-Gm sin digerir. Carril 2: DNA de la construcción pGEM-Gm digerido con *PstI* (productos de restricción de 2564 y 1349 pb marcados con flecha azul) Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. **D)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzima *XhoI* y *SpeI*. Carril 1: DNA de la construcción pGEM-Gm sin digerir. Carril 2: DNA de la construcción pGEM-Gm digerido con *XhoI* y *SpeI* (productos de restricción de 3001 y 900 pb marcados con flecha azul) Carril 3: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

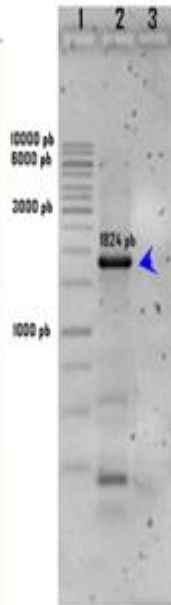
11.6.2. Construcción del vector pAZBR-T7-Gm.

Se cambió el antibiótico de selección para ello se ligó el esqueleto del vector pAZBR-T7 con el casete de gentamicina, esta construcción se transformó en *E. coli* DH5 α , se seleccionó con gentamicina y ampicilina, se comprobó por PCR y restricción (Figura 29), esta construcción se llamó pAZBR-Gm.

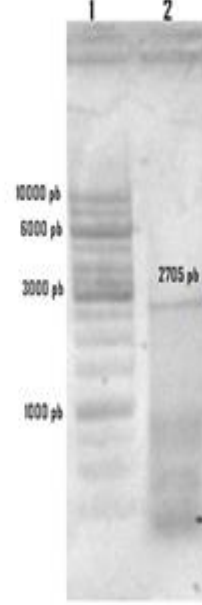
A) Construcción



B) PCR I



C) PCR II



D) Digestión

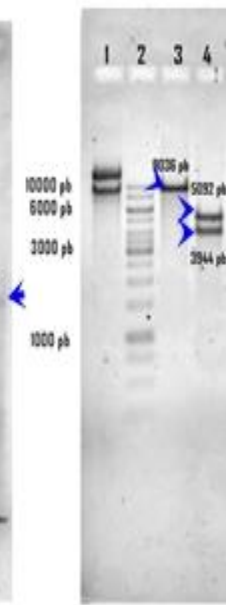


Figura 29. Construcción del plásmido pAZBR-Gm. **A)** Mapa de pAZBR-Gm. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR I usando iniciadores GmFXhoI y MTF-NcoIR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR de 1824 pb marcado con flecha azul. Carril 3: Control negativo. **C)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR II usando iniciadores CMP-PstIF y MTF-NcoIR. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 2: Producto de PCR de 2705 pb marcado con flecha azul. **D)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de restricción con enzimas PstI o EcoRV. Carril 1: DNA de la construcción pAZBR-Gm sin digerir. Carril 2. Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 3. DNA de la construcción pAZBR-Gm digerido con PstI (producto de restricción de 9036 pb marcado con flecha azul) Carril 4. DNA de la construcción pAZBR-Gm digerido con EcoRV (productos de restricción de 5092 pb y 3944 pb marcados con flecha azul).

Posteriormente se subclonó el gen *cdgF* en el vector pAZBR-Gm, se seleccionó con los mismos antibióticos y se comprobó por PCR y restricción, la cepa confirmada se denominó pAZBR-*cdgF*. Este es el plásmido integrativo, el cual nos va a permitir restaurar el gen *cdgF* en el cromosoma de *Azospirillum brasilense* 40391. (Ver Figura 30).

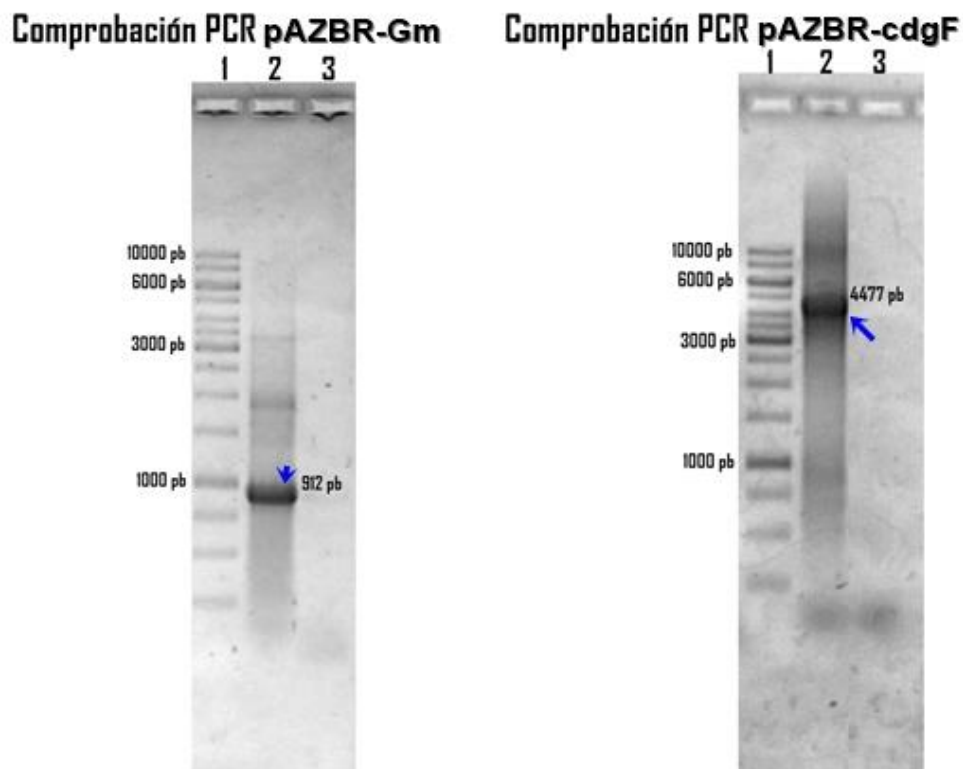


Figura 31. Comprobación de construcciones en *E. coli* S17.1. A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR usando iniciadores GmFXhol y GmRSpel. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2: producto de PCR de 912 pb (marcado con flecha azul) de DNA plasmídico de *E. coli* S17.1 pAZBR-Gm clona 50. Carril 3: Control negativo. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR usando iniciadores c-AB40391F y GmRSpel. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2: producto de PCR de 4477 pb (marcado con flecha azul) de DNA plasmídico *E. coli* S17.1 pAZBR-cdgF clona 1. Carril 3: Control negativo.

11.7.2. Conjugación biparental entre *A. brasilense* y *E. coli* S17.1

Se realizó una conjugación biparental entre las cepas *E. coli* S17.1 pAZBR-T7-Gm clona 50 (donadora) y *A. brasilense* 40391 (receptora). Las transconjugantes obtenidas se seleccionaron en medio K-lactato con antibiótico gentamicina (50 µg/ml), se contraseleccionaron con tetraciclina, se comprobaron por PCR. (Ver figura 32).

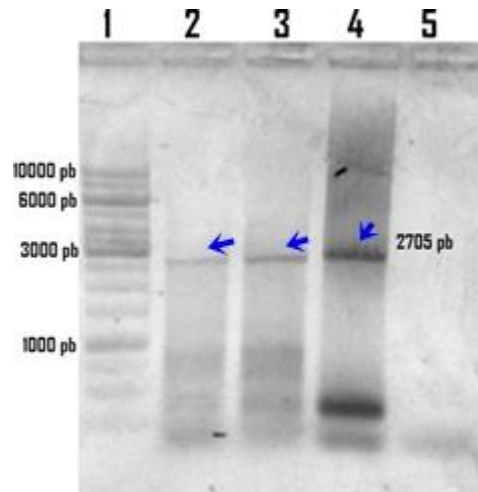


Figura 32. Comprobación la cepa control *A. brasilense* 40392. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de productos de PCR usando iniciadores CMP-*Pst*I y MTF-*Nco*II. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de 1 Kb. Carril 2: producto de PCR de 2705 pb (marcado con flecha azul) del DNA plasmídico de *E. coli* S17.1 pAZBR-T7-Gm. Carril 3: producto de PCR de 2705 pb (marcado con flecha azul) de DNA genómico de *A. brasilense* 40392 clona 20. Carril 4: producto de PCR de 2705 pb (marcado con flecha azul) de DNA genómico de *A. brasilense* 40392 clona 57. Carril 5: Control negativo.

Se realizó lo mismo para la cepa complementada, tomando como cepa donadora a *E. coli* pAZBR-cdgF. Se obtuvieron cinco clonas candidatas resistentes a gentamicina y a kanamicina y sensibles a tetraciclina, las cuales se tendrán que comprobar por PCR, además será secuenciar el producto de PCR del gen *cdgF* con su propia región promotora, los cuales por motivos de pandemia no fue posible realizar.

12. DISCUSION DE RESULTADOS

El di-GMPc es un segundo mensajero bacteriano responsable de controlar una amplia variedad de comportamientos bacterianos como son la transición del estilo de vida móvil a formación de biopelícula y viceversa (Römling, *et al.*, 2013). Varios reportes han demostrado la participación del di-GMPc en la producción de exopolisacáridos, formación de biopelícula, quimiotaxis, diferentes tipos de movilidad, virulencia, resistencia a antibióticos, morfología celular y regulación del ciclo celular (Whitney, *et al.*, 2012; Ferreira, *et al.*, 2011; Kuchma, *et al.*, 2007; McCarthy, *et al.*, 2008; Nicastro, *et al.*, 2014). Los altos niveles intracelulares de di-GMPc promueven la formación de biopelícula, mientras bajos niveles incrementan la movilidad bacteriana. Los cambios en la concentración intracelular de di-GMPc son controlados por las DGCs y las PDEs (Ausmees, *et al.*, 2001; Tamayo, *et al.*, 2005). Los dominios catalíticos de las DGCs deben adquirir una conformación antiparalela para formar un sitio activo competente que permita la generación del producto cíclico. Adicionalmente, se ha reportado que los dominios EAL que catalizan la hidrólisis del di-GMPc a pGpG requieren la formación de dímeros para potenciar su actividad. Este requisito de dimerización en este tipo de enzimas y la presencia de dominios accesorios muchos de ellos localizados en el extremo N-terminal de las DGCs y las PDEs, sugieren que estas enzimas están sujetas a una regulación fina que controla de manera precisa la degradación y producción de di-GMPc (Sundriyal, *et al.*, 2014; Minasov, *et al.*, 2009). Los cuales detectarían señales o transmitirían estas a la parte catalítica de la proteína para regular su función. Además, una gran cantidad de este tipo de enzimas que se encuentran anotadas en las bases de datos son proteínas integrales de membrana algunas de ellas con dominios sensores localizados en el periplasma bacteriano y con los dominios de DGC o PDE localizados en el citoplasma (Seshasayee, *et al.*, 2010).

A pesar de la amplia existencia de DGCs y PDEs codificadas en los genomas bacterianos ancladas a la membrana citoplasmática, pocos estudios han profundizado en los mecanismos de activación. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, el operon YifBNR, requerido para la persistencia de la fibrosis cística, codifica para una DGC transmembranal, la cual controla finamente su actividad a través de otras dos proteínas codificadas por el operón, una de ellas localizada en el periplasma y la otra localizada en la membrana externa (Malone, *et al.*, 2010). Por otra parte, una de las proteínas mejor caracterizada a la fecha es LapD de *P. fluorescens*, una proteína híbrida DGC-EAL anclada a la membrana citoplasmática que se encuentra desprovista de las funciones de DGC o PDE, y en su lugar detecta fluctuaciones intracelulares de di-GMPc a través de su dominio EAL y transmite esta información a su dominio periplásmico, el cual en turno recluta a la proteasa (LapG) que libera a una adhesina crucial (LapA) que promueve la formación de biopelícula en respuesta a limitación de fosfato (Navarro, *et al.*, 2011). En este caso, la información de la concentración intracelular de di-GMPc es transmitida del citoplasma bacteriano

al periplasma, el cual se considera un mecanismo de transducción de señales del interior de la célula al exterior, opuesto al que ocurre en el sistema YifBNR.

A. brasilense es una bacteria que habita la rizosfera y promueve el crecimiento de las plantas al colonizar de forma externa o interna las raíces. La bacteria tiene que lidiar con un entorno muy competitivo en la rizosfera y los suelos. Por tal motivo, para asegurar su supervivencia y estancia en la planta, necesita formar biopelículas en la superficie de la raíz (Ramírez, *et al.*, 2018). De acuerdo con los análisis anteriores a este estudio se analizó el gen *cdgF*, de *A. brasilense* Sp245 el cual codifica para una proteína híbrida que contiene un dominio de DGC, y otro de PDE, dos dominios citosólicos PAS, dos dominios transmembranales y dos dominios periplásmicos CACHE Figura A1. Las proteínas híbridas pueden tener ambas funciones, de síntesis y degradación del di-GMP-c, funciones antagónicas, lo frecuente es que bajo ciertas condiciones la actividad de un dominio se vea promovida, mientras que la del otro dominio ocurra en otras condiciones diferentes. Los dominios accesorios detectan señales provenientes del medio, generando cambios conformacionales, los cuales modulan la actividad de los dominios catalíticos de estas proteínas híbridas.

Los alineamientos de los dominios de DGC y PDE de la proteína CdgF mostraron que el dominio de DGC se encuentra conservado, mientras que el dominio de PDE presenta un residuo glicina en lugar de alanina (EGL-EAL). Los estudios en nuestro laboratorio mostraron que la proteína exhibió actividad enzimática. De manera similar, la proteína PDE, RocR de *P. aeruginosa*, tiene actividad catalítica a pesar de que el motivo es degenerado (EVL), (Römling, *et al.*, 2013). No obstante CdgD, no presentó actividad catalítica de DGC bajo las condiciones estudiadas. Varios factores podrían ser considerados como responsables de tal resultado: el uso de etiquetas que favorecieron la purificación de la proteína, la ausencia de los dominios CACHE que pudieran estar involucrados en el correcto plegamiento de la proteína, ya que para su purificación este dominio fue eliminado y sería requerido para su actividad, o que el dominio CACHE detectará ciertas señales que activaran al dominio DGC.

Por otra parte, es interesante indicar que la proteína tiene también dominios PAS de señalización que podrían detectar señales tanto del medio extracelular como del intracelular. Considerando esto cuando se adicionó FAD+ al ensayo de actividad de PDE se observó un aumento de tres veces la actividad (Salazar, 2017). Lo cual sugiere que estos dominios podrían funcionar uniendo al FAD y modular la función de PDE. De manera presuntiva sería interesante realizar un análisis informático de modelaje molecular que apoyaría esta propuesta.

Se propone que el dominio CACHE puede detectar moléculas del medio extracelular, promoviendo la actividad de DGC como ocurre en la proteína GcbC de *P. fluorescens*, en donde se promueve la formación de biopelícula al añadir citrato al medio de crecimiento. Al realizar ensayos de biopelícula mediante el método de

cristal violeta añadiendo moléculas señal a distintas concentraciones se esperaría que el ligando adecuado incrementa la formación de biopelícula. (Giacalone, *et al.*, 2018).

Varios quimiorreceptores bacterianos tienen dominios de unión a ligando de la familia dCACHE, el cual es una estructura con dos dominios tipo PAS, uno que se encuentra proximal y otro distal a la membrana citoplasmática. Este tipo de dominios de señalización CACHE se encuentran presentes en una gran variedad de proteínas, entre las cuales encontramos proteínas aceptoras de grupos metilos (MCP), DGCs, cinasas histidínicas y reguladores de respuesta (Upadhyay, *et al.*, 2016). Estos dominios de unión a ligando pueden clasificarse de acuerdo al tamaño en el cluster I (aquellos que tienen un tamaño de aproximadamente 150 aminoácidos) o cluster II (aproximadamente 250 aminoácidos). Con base a esta clasificación, los dominios CACHE de CdgF pueden ser agrupados dentro del cluster II.

Se han identificado dominios CACHE en decenas de miles de proteínas de transducción de señales, siendo este dominio el más abundante en dominios extracelulares en procariontes, el cual pudiera haber sido originado a partir de dominios intracelulares simples PAS/GAF, lo anterior por estudios bioinformáticos realizados en secuencias de genomas. La alfa hélice larga N-terminal es característica de los dominios CACHE al compararse con dominios PAS y GAF. Esta alfa hélice es una extensión de la primera hélice transmembranal, y donde la parte C-terminal de este dominio se conecta con una segunda hélice transmembranal, siendo indicativo de que es un dominio sensor extracelular. De acuerdo con estudios estructurales de los dominios CACHE, se tomaron en cuenta varios factores para poder considerar a un dominio CACHE, entre estos se encuentra que (1) los dominios sCACHE y dCACHE ocupan completamente la región periplasmática entre dos hélices transmembranales, (2) los dominios CACHE se han identificado exclusivamente en proteínas que contienen dominios de señalización, y (3) la mayoría de los dominios CACHE se encuentran en procariontes; además de que pueden existir dominios únicos CACHE (sCACHE) y dominios dobles CACHE (dCACHE). De acuerdo a estos factores y algunos elementos estructurales importantes, se podría deducir que los dos dominios CACHE presentes en CdgF son de tipo dCACHE_2, en donde los elementos que definen este tipo de dominio CACHE son la presencia de una hélice N-terminal y que no contienen las 3 hojas- β -plegadas presentes en otros dominios CACHE (Upadhyay, *et al.*, 2016).

La proteína TlpC de *Helicobacter pylori* contiene un dominio extracitoplasmático de doble CACHE de unión a ligando que puede detectar lactato para favorecer la quimiotaxis. La estructura secundaria de este dominio muestra características estructurales secundarias importantes para poder definir a un dominio dCACHE_1, el cual consta de una alfa-hélice larga N-terminal, un CACHE distal constituido por dos alfa-hélices y 6 hojas beta-plegada, un CACHE proximal constituido por cuatro

alfa-hélices y 5 hojas betas plegadas. El dominio dCACHE_2 de CdgF de *A. brasilense* presenta la mayoría de estas características estructurales las cuales incluyen la alfa-helice larga N-terminal, un CACHE distal formado por 3 alfa-hélices, tres hojas beta-plegada, un CACHE distal constituido por cuatro alfa hélices y 4 hojas beta-plegadas (Figura 11). Al realizar el modelado por homología del dominio dCACHE_2 de CdgF se encontró que es estructuralmente similar, a pesar de que hay baja identidad de secuencia de aminoácidos (Machuca, *et al.*, 2017).

Debido a que no existe un cristal que contenga dominios CACHE, PAS, GGDEF y EAL juntos, se realizó el modelado por homología en tres partes, uno que contiene los dos dominios CACHE, uno con los dos dominios PAS, y uno de los dominios GGDEF-EAL. Se obtuvieron modelos con valores en C-score, Tm-score y RMSD aceptables (Figuras 11, 14 y 17). Con estos modelos se puede tener una propuesta de que ligandos pudieran estar detectando los dominios señalización, en donde se propone que el FAD+ pudiera ser detectado por los dominios PAS; mientras que el dominio CACHE pudiera estar detectando urea, 1,2,4-trimetilbenceno, N-acetilglucosamina, entre otros, siendo el mejor ligando la urea. Con estos datos podría sugerirse que, si se añade urea al medio, la actividad del dominio DGC podría verse favorecida. Sin embargo, esta hipótesis tendrá que verificarse en futuros trabajos.

Con el objetivo de evaluar la función del gen *cdgF* en la movilidad y formación de biopelícula, se obtuvo la cepa mutante *A. brasilense* 40391 (eliminando el gen *cdgF*) y la cepa complementada con el gen la región promotora nativa cepa anotada como *A. brasilense* 40393. Las cuales en estudios posteriores permitirán evaluar distintas condiciones de crecimiento para poder encontrar bajo cuales condiciones la proteína actúa como DGC y bajo cuales como PDE.

Para obtener la cepa mutante se siguió la estrategia de reemplazo alélico, en donde se usó el vector suicida pJMS-Km que tiene origen de replicación de *E. coli*, el cual no es reconocido por la maquinaria replicativa de *A. brasilense*.

Por otro lado, para integrar el gen eliminado a la cepa mutante, se usó el plásmido suicida pAZBR-T7-mCherry, siguiendo la misma estrategia que se utilizó para la obtención de la cepa mutante, con la diferencia de que las regiones homologas del vector con las del cromosoma de *A. brasilense* son las de un locus neutro en donde ya se ha visto que no hay afección en el crecimiento microbiano al integrarse fragmentos en ese locus. Se construyó el vector integrativo por la sustitución del gen de resistencia a kanamicina por uno de gentamicina así facilitar la selección de las cepas complementadas. Con lo cual se permitió obtener una complementación en *cis* en una sola copia del gen con su región promotora. Mostrando la eficacia de la construcción de este nuevo vector que está ya disponible en nuestro laboratorio para futuros trabajos.

Ya obtenidas la cepa mutante, cepa control y la cepa complementada, además de la cepa silvestre, se deberán realizar ensayos de evaluación de fenotipos de biopelícula y movilidad en distintas condiciones y confirmar la función de este gen.

13. CONCLUSIONES.

1. El análisis bioinformático predice que los dominios CACHE participarían en la modulación de la actividad de DGC.
2. La proteína CdgF tiene un doble dominio CACHE de tipo dCACHE_2 que pudiera detectar Urea.
3. Se implementó la estrategia de complementación en *cis*, lo que permitirá analizar la contribución de genes en determinado fenotipo, sin el problema de aumento dosis génica.

14. PERSPECTIVAS.

1. Comprobar por PCR la cepa complementada *A. brasilense* 40393.
2. Secuenciar el producto de PCR del gen *cdgF*.
3. Realizar ensayos de biopelícula y movilidad evaluando las cepas silvestre, mutante (*A. brasilense* 40391), cepa control (*A. brasilense* 40392) y cepa complementada del gen *cdgF* (*A. brasilense* 40393), adicionando distintas moléculas señal.
4. Determinar la función de diguanilato ciclasa de la proteína CdgF.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Alexandre, G. (2015). Chemotaxis in *Azospirillum*. Handbook for *Azospirillum*, 101–114. doi:10.1007/978-3-319-06542-7_6
2. Alexandre, G., Greer, S. E., & Zhulin, I. B. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 6042–6048. doi:10.1128/jb.182.21.6042-6048.2000
3. Amikam, D., & Galperin, M. Y. (2005). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22(1), 3–6. doi:10.1093/bioinformatics/bti739
4. Arruebarrena, D. A., Pereyra, C., Moreno, R. L., Xiqui, V. M. L., Baca, B. E., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2012). Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 338(1), 77–85. doi:10.1111/1574-6968.12030
5. Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., & Lindberg, M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 204(1), 163–167. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10880.x
6. Bharati, B. K., Sharma, I. M., Kasetty, S., Kumar, M., Mukherjee, R., & Chatterji, D. (2012). A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 158(Pt_6), 1415–1427. doi:10.1099/mic.0.053892-0
7. Barends, T. R. M., Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A., & Schlichting, I. (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, 459(7249), 1015–1018. doi:10.1038/nature07966
8. Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Themaat, E. V. L., & Schulze, L. P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106
9. Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 19–54. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737
10. Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. doi:10.1016/j.tim.2004.11.006
11. Cáceres E. A. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and environmental microbiology*, 44(4), 990–991. doi:10.1128/AEM.44.4.990-991.1982
12. Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(49), 17084–17089. doi:10.1073/pnas.0406134101
13. Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., & Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30829–30837. doi:10.1074/jbc.m504429200
14. Domingues, F. D. C., Cecato, U., Trento, B. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(1), 223-240. Epub 11 de junio de 2020. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
15. Escalona, A. M. A., & Hernández, M. L. G. (2003). Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *La ciencia y el hombre*, 16(1). Recuperado de <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/microorganismos/micro.html>
16. Ferreira, R. B. R., Chodur, D. M., Antunes, L. C. M., Trimble, M. J., & McCarter, L. L. (2011). Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the *Vibrio parahaemolyticus* Scr network. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 914–924. doi:10.1128/jb.05807-11
17. Giacalone, D., Smith, T. J., Collins, A. J., Sondermann, H., Koziol, L. J., & O'Toole, G. A. (2018). Ligand-mediated biofilm formation via enhanced physical interaction between a diguanylate cyclase and its receptor. *mBio*, 9(4), e01254-18. doi:10.1128/mBio.01254-18

18. Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395–412. doi:10.1016/j.soilbio.2004.08.030
19. Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 263–273. doi:10.1038/nrmicro2109
20. Hengge, R. (2016). Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150498. doi:10.1098/rstb.2015.0498
21. Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310–347. doi:10.1128/mubr.00041-08
22. Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M., & O’Toole, G. A. (2007). BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8165–8178. doi:10.1128/jb.00586-07
23. Machuca, M. A., Johnson, K. S., Liu, Y. C., Steer, D. L., Ottemann, K. M., & Roujeinikova, A. (2017). *Helicobacter pylori* chemoreceptor TlpC mediates chemotaxis to lactate. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-14372-2
24. Malone, J. G., Jaeger, T., Spangler, C., Ritz, D., Spang, A., Arriemerlou, C., & Jenal, U. (2010). YfiBNR Mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000804. doi:10.1371/journal.ppat.1000804
25. Marcos, J. C., (2017). Papel de la indol piruvato ferredoxina oxidorreductasa de *Azospirillum brasilense* en la producción de ácido indol-3-acético y la colonización al trigo (Maestría). Instituto de Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
26. Ramírez, M. A., Pacheco, C. M., Cruz, P. 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). doi:10.1186/s12866-018-1157-0
27. Ramírez, M. A., López, L. L. I., Xiqui, V. M. L., Jijón, M. S., Romero, O. A., & Baca, B. E. (2016). The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research in microbiology*, 167(3), 190–201. doi:10.1016/j.resmic.2015.12.004
28. Ramírez, M. A., Fernández, D. I. J., Núñez, R. K. J., Xiqui, V. M. L., & Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico [Networks involving quorum sensing, cyclic-di-GMP and nitric oxide on biofilm production in bacteria]. *Revista Argentina de microbiología*, 46(3), 242–255. doi:10.1016/S0325-7541(14)70079-3
29. McCarthy, Y., Ryan, R. P., O’donovan, K., He, Y. Q., Jiang, B. L., Feng, J. X., & Dow, J. M. (2008). The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Plant Pathology*, 9(6), 819–824. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00495.x
30. 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. doi:10.1038/nrmicro2695
31. Méndez, O. M. M., & Membrillo, H. J. (2005) Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4):130-139.
32. Minasov, G., Padavattan, S., Shuvalova, L., Brunzelle, J. S., Miller, D. J., Baslé, A., & Anderson, W. F. (2009). Crystal structures of Ykul and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13174–13184. doi:10.1074/jbc.m808221200
33. Monds, R. D., & O’Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87. doi:10.1016/j.tim.2008.11.001

34. Mukherjee, T., Kumar, D., Burriss, N., Xie, Z., & Alexandre, G. (2016). *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. *Journal of bacteriology*, 198(12), 1764–1772. doi:10.1128/JB.00020-16
35. Navarro, M. V. A. S., Newell, P. D., Krasteva, P. V., Chatterjee, D., Madden, D. R., O'Toole, G. A., & Sondermann, H. (2011). Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biology*, 9(2), e1000588. doi:10.1371/journal.pbio.1000588
36. Nesper, J., Hug, I., Kato, S., Hee, C. S., Habazettl, J. M., Manfredi, P., Grzesiek, S., Schirmer, T., Emonet, T., & Jenal, U. (2017). Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of CheY-like regulators. *eLife*, 6, e28842. doi:10.7554/eLife.28842
37. Newell, P. D., Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3461–3466. doi:10.1073/pnas.0808933106
38. Nicastro, G. G., Kaihami, G. H., Pereira, T. O., Meireles, D. A., Groleau, M.-C., Déziel, E., & Baldini, R. L. (2014). Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environmental Microbiology*, 16(5), 1321–1333. doi:10.1111/1462-2920.12422
39. O'Neal, L., Akhter, S., & Alexandre, G. (2019). A PilZ-containing chemotaxis receptor mediates oxygen and wheat root sensing in *Azospirillum brasilense*. *Frontiers in microbiology*, 10, 312. doi:10.3389/fmicb.2019.00312
40. Pedraza, O. R., Filippone, P. M., Fontana, C., Salazar, M. S., Ramírez, M. A., Sierra, C. D., Baca, B. E. (2020). Beneficial Microbes in Agro-Ecology. Chapter 6 - *Azospirillum*. Chapter 6 - *Azospirillum*, Academic Press. Pp 73-105. ISBN 9780128234143. doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X.
41. Pereg, L., & McMillan, M. (2015). Molecular tools to study *Azospirillum* sp. and other related plant growth promoting rhizobacteria. *Handbook for Azospirillum*, 65–82. doi:10.1007/978-3-319-06542-7_4
42. Perez, M. D. & SanJuan, J. (2019). Chapter 1. Cyclic di-GMP regulation in beneficial plant-microbe interactions. *microbial probiotics for agricultural systems, sustainability in plant and crop protection* Pp. 6-15. doi:10.1007/978-3-030-17597-9_1.
43. Prada, R. H. A. (2014). Papel del segundo mensajero c-di-GMP en *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Tesis doctoral). Universidad de Granada. Granada, España.
44. 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*, 77(1), 1–52. doi:10.1128/mubr.00043-12
45. Salazar, G. A. J. (2017). Caracterización funcional de una diguanilato ciclase / fosfodiesterasa putativa con dominio EAL degenerado. (Maestría). Instituto de Ciencias Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
46. Salcedo, F., Pereyra, C. M., Arruebarrena, D. P. A., Lamattina, L., & Creus, C. M. (2015). Methods for studying biofilms in *Azospirillum* and other PGPRs. *Handbook for Azospirillum*, 199–229. doi:10.1007/978-3-319-06542-7_11
47. Seshasayee, A. S. N., Fraser, G. M., & Luscombe, N. M. (2010). Comparative genomics of cyclic-di-GMP signaling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Research*, 38(18), 5970–5981. doi:10.1093/nar/gkq382
48. Srivastava, D., Harris, R. C., & Waters, C. M. (2011). Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6331–6341. doi:10.1128/jb.05167-11
49. 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. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x
50. Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U., & Schirmer, T. (2014). Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 6978–6990. doi:10.1074/jbc.m113.516195

51. Tamayo, R., Tischler, A. D., & Camilli, A. (2005). The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33324–33330. doi:10.1074/jbc.m506500200
52. Teixeira, R. D., Guzzo, C. R., Arévalo, S. J., Andrade, M. O., Abrahão, J., de Souza, R. F., & Farah, C. S. (2018). A bipartite periplasmic receptor–diguanylate cyclase pair (XAC2383–XAC2382) in the bacterium *Xanthomonas citri*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10767–10781. doi:10.1074/jbc.ra118.003475
53. Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D., & Zhulin, I. B. (2016). Cache domains that are homologous to, but different from PAS domains comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes. *PLoS computational biology*, 12(4), e1004862. doi:10.1371/journal.pcbi.1004862
54. Viruega, G. V., Acatitla, J. I., Reyes, C. S., Baca, B. E., & Ramírez, M. A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology letters*. 166:659-668. DOI 10.1099/mic.0.000929
55. Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024–1037. doi:10.1038/nrm1524
56. Wang, D. C., Jiang, C. H., Zhang, L. N., Chen, L., Zhang, X. Y., & Guo, J. H. (2019). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6271. doi:10.3390/ijms20246271
57. Whitney, J. C., Colvin, K. M., Marmont, L. S., Robinson, H., Parsek, M. R., & Howell, P. L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23582–23593. doi:10.1074/jbc.m112.375378
58. Wilksch, J. J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J. L., Short, K. R., Cao, H., & Strugnell, R. A. (2011). MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002204. doi:10.1371/journal.ppat.1002204
59. Zhulin, I. B., Bespalov, V. A., Johnson, M. S., & Taylor, B. L. (1996). Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. *Journal of bacteriology*, 178(17), 5199–5204. doi:10.1128/jb.178.17.5199-5204.1996

16. ANEXOS

ALINEAMIENTO DEL DOMINIO GGDEF/EAL DE LA PROTEINA AZOBR_40391 (CCC97222.1) DE *Azospirillum brasilense* CON PROTEÍNAS PdeA (YP_002518880.1) de *Caulobacter crescentus*, PdeB (SQH74053.1) de *Shewanella oneidensis* proteínas híbridas.

SQH74053.1	-ISNLLNHKQRVGTGVILLRDRITQEELLKRKLHQRANFDPITSLNRRAFEERLAA----	451
CCC97222.1	SIQVMRNEAGEAVNYIAAFSDITEKRAQEERIRHLAQYDFLTDLPNRFLLRDLERAMLA	672
YP_002518880.1	-----TKFSASELCDLTLGLLDRRSF----LARARER	144
	:: * * * *	
SQH74053.1	FSLGAQSVVAICYFLEQFKLINDSCGHSAGRMLAMVARAMQSCIQDMLARLGGDEF	511
CCC97222.1	ADRHGTVGLLFVLDLRFKINDSLGHGVGRLLRAVGARLLGTVRSSTVSRQGGDEFV	732
YP_002518880.1	LA-QEGTHQLVVALDLRLRRLEALGHERALVLAALGSRLLAAAFIAQILGRIGEDEFA	203
	. : **::: : **: * . * * . : : * * **	
SQH74053.1	LAIRDHSALEVAQLAKRMVASVSMQVLRDNACHCKVGVSAAGIAR--APYISAKELLKD	569
CCC97222.1	ILVNDLDGPDAAACSVARKVLRAMTESFPVDGHGELQISPSIGIALYP--DDATIDALLKC	790
YP_002518880.1	VLCQPLGYEPSDV-----LRSALEQPLRVAGFDIHPTLSIGAVSAEGLDAPDAEALLRR	258
	: . . . : : : : : * * .	
SQH74053.1	ADIACLAASKSGSNQVHFYDDKDKDLTCQRNAPMWA-VRIAQALEHNELLYYPIKGMG	628
CCC97222.1	ADMAMYAAKEAGRANHQFFTPPELNK---RASERMWLESNLRHALADNELELHFQPFVAVD	847
YP_002518880.1	AELAVEAAAAGRGAAYGRAMET---DGLSRLALEADLRGAIGRGEITPYFQPIVRLS	315
	* : * * * : : : : : * : . * : : * * . .	
SQH74053.1	SGKHRQRMELLLEIQEPSGRILAPAQFIAAERFKLMNDVDKEVIR---KTFLWLSLHE	684
CCC97222.1	GRR-LVGAELLRWRRRDGMTIPPGQFIPVAEDTGLIQPIGDWVLGEACRRADLLARGH	906
YP_002518880.1	TGA-LSGFEALAWIHPRRGMPLPDEFPLIEEMGLMSELGAHMHAAAQQLSTWR-AAH	373
	* * * . : : * : * : * * . : . : : : .	
SQH74053.1	EIWEDHCISINLSGNSLGAEGMADYIIQOFRFAIPSECICFETETSAIQNRNRAMDML	744
CCC97222.1	----PILIAINLSAVQLRRPGLADRVAFWLDAYKVPARCLELVTESVLMDESDMVTGTF	962
YP_002518880.1	PAMGNLTVSVLSTGEIDRPLGADVAVETLRVNRRLPRGALKLVTESDIMRDPERAAVIL	433
	: : * * * . : : * : . : : : : * : . : : * * * : : : .	
SQH74053.1	AYLRKLGFSFALDFGSGFASVGYLKELPVDYVYIDGCFVKNLATNAKDYAIVKSIHDVC	804
CCC97222.1	ARLRMGVALAIDDFCTGYSSLSYLKRFVVDKLIKIDRSFVTSLTDGSDGGAIAEAIIGMA	1022
YP_002518880.1	KTLRDAGAGLALDFEFTGFSSLSYLTRLFPDFTLIKIDRYFVRTMGNNAGSAKIVRSVVKLG	493
	* * . : : * * * * : * : * . : . : * * * * . : . : . * . : : .	
SQH74053.1	VVMGIETVAIFVENQDIIDKLQEIGINYAGYAIGRPQPLSSYRPSAAVSQLTA-----	859
CCC97222.1	RSLRMQTLAAGVETEEOFGGLARLGCDDIQGYLLGREMPYDDFVAFIARHA---ATP-EA	1078
YP_002518880.1	QDLDLVVVAVGVENAEMAHALQSLGCDYGGFGFYAPALSPQEAEVYLNEAYVDGAAPVKA	553
	: : : * * * * . : * : * : * * :	

- Sitio de inhibición primario
- Sitio de inhibición secundario
- Sitio activo primario

- Sitio de enlace al di-GMP-c
- Lazo 6
- Sitio activo primario
- Sitio de unión a metal
- Sitio de unión a agua

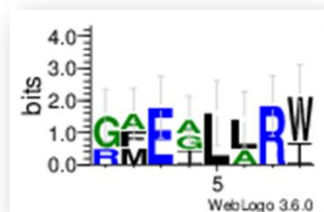
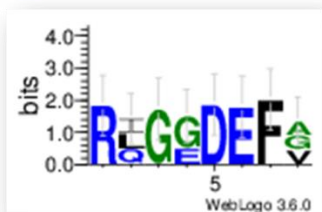


Figura 1A. Alineamiento de dominios DGC-PDE CdgF con proteínas híbridas DGC-PDE. En la imagen se aprecia el alineamiento de la proteína CdgF (ccc97222.1) de interés con otras dos proteínas que se sabe que son híbridas, es decir que tienen ambos dominios DGC-PDE. Se muestra en distintos colores los sitios principales necesarios para que se pueda llevar la catalisis y otros sitios adicionales como de unión a metal o agua. En la parte inferior de la imagen se puede observar web logo, donde se muestran la frecuencia de aminoácidos de los sitios importantes de DGC (izquierda) y PDE (derecha).

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
<input type="checkbox"/> select all 0 sequences selected							GenBank Graphics Distance tree of results				
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input type="checkbox"/>	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	1557	1557	97%	0.0	99.76%	CP022253.1				
<input type="checkbox"/>	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	1557	1557	97%	0.0	99.76%	HE577327.1				

Figura 2A. Blast de la secuenciación del fragmento A. Iniciadores utilizados AB40391FA y AB40391RA a partir de pJMS-FAB40391. Se puede apreciar un porcentaje de identidad del 99.76%, lo cual es indicativo que el fragmento A obtenido del vector pJMS-FAB40391 si tiene es el correspondiente a la zona de homología esperada del fragmento A.

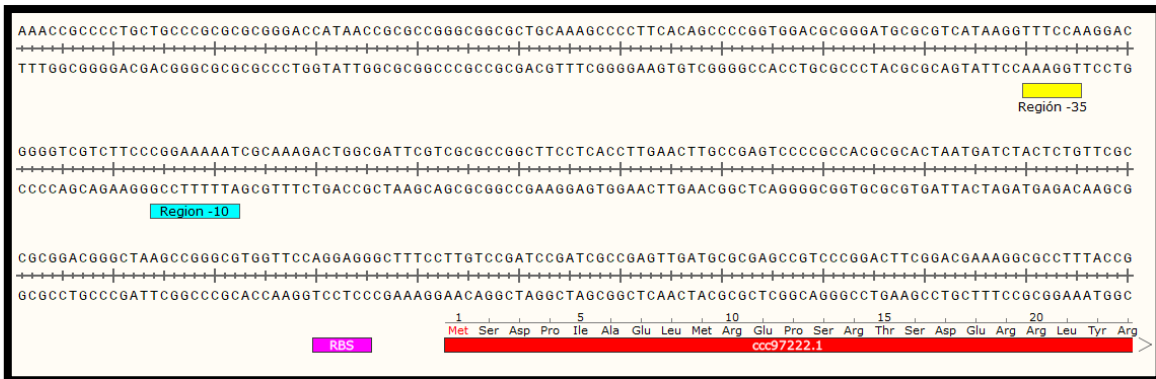
Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	100	?
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected							GenBank Graphics Distance tree of results				
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession				
<input checked="" type="checkbox"/>	Azospirillum brasilense Sp245 chromosome	1821	1821	97%	0.0	99.90%	CP022253.1				
<input checked="" type="checkbox"/>	Azospirillum brasilense Sp245 main chromosome complete genome	1821	1821	97%	0.0	99.90%	HE577327.1				

Figura 3A. Blast de la secuenciación del fragmento B. Iniciadores utilizados AB40391FB y AB40391RBA a partir de vector pJMS-FAB40391. Se puede apreciar un porcentaje de identidad del 99.90%, lo cual es indicativo que el fragmento B obtenido del vector pJMS-FAB40391 si tiene es el correspondiente a la zona de homología esperada del fragmento B.

Se utilizó el programa BPROM para predecir la región promotora del gen *cdgF*.

El algoritmo que utiliza BPROM predice las posibles posiciones de inicio de la transcripción de genes bacterianos regulados por los promotores sigma70 de *E. coli*. Tiene una función discriminante que combina características que describen motivos funcionales y composición de oligonucleótidos de estos sitios. BPROM tiene una precisión de reconocimiento del promotor de *E. coli* de aproximadamente el 80%. Para un mayor acercamiento se requiere analizar ORFs.

Con ayuda del programa Bprom, se encontró una presunta región promotora del gen *cdgF*, la cual podría ser reconocida y regulada por el factor sigma 70 para iniciar la transcripción. Este promotor se caracteriza porque tiene las secuencias conservadas en las posiciones -10 (CGGAAAAT) y -35 (TTTCCA) . Se obtuvieron un score de 47 para la secuencia -10 y un score de 42 para la secuencia -35, indicativo de que es un buen valor para considerarse buenos promotores.



```
> test sequence
Length of sequence-      337
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      214 LDF- 0.92
-10 box at pos.      199 CGGAAAAT Score 47
-35 box at pos.      175 TTTCCA  Score 42
```

Figura 4A. Análisis de región promotora del gen *cdgF*. Con ayuda del programa Bprom, se localizó la región promotora del gen *cdgF*. Posteriormente, se diseñaron iniciadores para amplificar el gen con el promotor nativo. Secuencia consenso factor sigma 70: región -35 (TTGACA) y región -10 (TATAAT).

Tabla Anexo 1. Mezcla de reacción para PCR de alta fidelidad y condiciones para la PCR de punto final para el fragmento A.

Reactivo	Para una reacción
Agua libre de nucleasas	8.45 µl
Buffer 10X PCR HF Taq-Pol	2.0 µl
MgSO ₂	1.25 µl
dNTPs	3 µl
Oligo Forward AB40391FA	0.5 µl
Oligo Reverse AB40391RA	0.5 µl
DMSO	1.0 µl
Platinum TaqPolimerasa HF	0.3 µl
TOTAL	17 µl
DNA	3 µl
TOTAL REACCIÓN	20 µl

• Temperaturas

- Desnaturalización
 - 95 °C, 5 min
- 30 ciclos de
 - Desnaturalización
 - 95 °C, 30 s
 - Alineamiento
 - 59 °C, 30 s
 - Extensión
 - 72 °C, 1 min
- Extensión
 - 72 °C, 7 min
- Finalización
 - 4 °C, tiempo ∞

Tabla Anexo 2. Mezcla de reacción para PCR de alta fidelidad y condiciones para la PCR de punto final para el fragmento B.

Reactivo	Para una reacción
Agua libre de nucleasas	8.45 µl
Buffer 10X PCR HF Taq-Pol	2.0 µl
MgSO ₂	1.25 µl
dNTPs	3 µl
Oligo Forward AB40391FB	0.5 µl
Oligo Reverse AB40391RB	0.5 µl
DMSO	1.0 µl
Platinum TaqPolimerasa HF	0.3 µl
TOTAL	17 µl
DNA	3 µl
TOTAL REACCIÓN	20 µl

• Temperaturas

- Desnaturalización
 - 95 °C, 5 min
- 30 ciclos de
 - Desnaturalización
 - 95 °C, 30 s
 - Alineamiento
 - 59 °C, 30 s
 - Extensión
 - 72 °C, 1 min
- Extensión
 - 72 °C, 5 min
- Finalización
 - 4 °C, tiempo ∞

Tabla anexo 3. Mezcla de reacción para PCR de alta fidelidad y condiciones para la PCR de punto final para el gen de gentamicina.

Reactivo	Para una reacción
Agua libre de nucleasas	12.05 µl
Buffer 10X PCR HF Taq-Pol	2.0 µl
MgSO ₂	1.25 µl
dNTPs	1 µl
Oligo Forward GmFXhol	0.7 µl
Oligo Reverse GmRSpel	0.7 µl
DMSO	1.0 µl
Platinum TaqPolimerasa HF	0.3 µl
TOTAL	19 µl
DNA pBBR1MCS-5	1 µl
TOTAL REACCIÓN	20 µl

• Temperaturas

- Desnaturalización
 - 95 °C, 3 min
- 30 ciclos de
 - Desnaturalización
 - 95 °C, 30 s
 - Alineamiento
 - 60 °C, 30 s
 - Extensión
 - 72 °C, 1 min
- Extensión
 - 72 °C, 10 min
- Finalización
 - 4 °C, tiempo ∞

Tabla Anexo 4. Mezcla de reacción para PCR de alta fidelidad y condiciones para la PCR de punto final para el fragmento del gen completo *cdgF* con su región promotora.

Reactivo	Para una reacción
Agua libre de nucleasas	11.05 μ l
Buffer 10X PCR HF Taq-Pol	2.0 μ l
MgSO ₂	1.25 μ l
dNTPs	1 μ l
Oligo Forward c-AB40391F	0.7 μ l
Oligo Reverse c-AB40391R	0.7 μ l
DMSO	1.0 μ l
Platinum TaqPolimerasa HF	0.3 μ l
TOTAL	18 μ l
DNA (500 ng/ μ l)	2 μ l
TOTAL REACCIÓN	20 μ l

• **Temperaturas**

- Desnaturalización
 - 95 °C, 5 min
- 30 ciclos de
 - Desnaturalización
 - 95 °C, 30 s
 - Alineamiento
 - 69°C, 30 s
 - Extensión
 - 72 °C, 3:30 min
- Extensión
 - 72 °C, 10 min
- Finalización
 - 4 °C, tiempo ∞