



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**Tesis**

“CdgB es una proteína híbrida (GGDEF y EAL) localizada en la membrana citoplasmática de *Azospirillum baldaniorum* Sp245.”

QUE PARA OBTENER EL GRADO:

**DOCTOR EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)**

PRESENTA:

**M.C. VICTOR IVÁN VIRUEGA GÓNGORA**

Asesor de tesis

**DR ALBERTO RAMIREZ MATA**

Febrero del 2023

## **ABREVIATURAS.**

**DGC:** Diguanilato ciclasa

**PDE:** Fosfodiesterasa

**CdgB:** Diguanilato ciclasa B

**PGPR:** Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas

**EPS:** Exopolisacáridos

**DiGMPc:** Ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato

**GTP:** Guanosin trifosfato

**Km:** Kanamicina

**Tc:** Tetraciclina

**LB:** Medio de cultivo Luria Bertani

**LB\*:** Medio de cultivo Luria-Bertani Modificado

**RC:** Rojo Congo

**Sm:** Estreptomina

**Ap:** Ampicilina

**DO:** Densidad óptica

**CV:** Cristal Violeta

**TMD:** Dominio Transmembranal

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**CLSM:** Confocal laser scanning microscopy

**ON:** Óxido nítrico

**SPE:** Sustancias poliméricas extracelulares

**Ap<sup>R</sup>:** Resistencia contra Ampicilina

**Gm<sup>R</sup>:** Resistencia contra Gentamicina

**Cm<sup>R</sup>:** Resistencia contra Chloramphenicol

**Km<sup>R</sup>:** Resistencia contra Kanamicina

**Tc<sup>R</sup>:** Resistencia contra Tetraciclina.

## INDICE

Resumen.....	5
Summary.....	6
1.INTRODUCCIÓN.....	7
1. Rizosfera.....	7
2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	8
3. Género <i>Azospirillum</i> .....	9
4. Colonización por <i>Azospirillum baldaniorum</i> .....	10
5. Quimiotaxis.....	12
6. Biopelícula.....	13
7. El segundo mensajero diGMPc .....	15
8. Síntesis del diGMPc por proteínas DGC.....	15
9. Hidrolisis del diGMPc por proteínas PDE.....	16
10. Proteínas híbridas.....	17
11. Posas del diGMPc.....	18
2. ANTECEDENTES.....	20
3. JUSTIFICACION.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	22
6. MATERIAL Y METODOS.....	23
6.1. Material biológico.....	23
6.2. Metodología.....	26
7. RESULTADOS.....	32
1. Análisis bioinformáticos.....	32

<b>7.1.1. La arquitectura de CdgB contiene varios dominios sensores y los dominios GGDEF y EAL .....</b>	<b>32</b>
<b>7.1.2. Modelado estructural y probable mecanismo DGC y PDE.....</b>	<b>34</b>
<b>7.2. Análisis fenotípicos.....</b>	<b>40</b>
<b>7.2.1. Generación de cepas derivadas de <i>A. baldaniorum</i> para .....</b>	<b>40</b>
<b>la evaluación de la actividad DGC y/o PDE en CdgB</b>	
<b>7.2.2 Curvas de crecimiento.....</b>	<b>40</b>
<b>7.2.3. Formación de biopelícula. ....</b>	<b>41</b>
<b>7.2.4. Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares.....</b>	<b>42</b>
<b>7.2.5. Ensayos de movilidad .....</b>	<b>45</b>
<b>7.2.6. Determinación de la concentración del diGMPc mediado por CdgB en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>7.2.7. Microcompartimentación de CdgB mediado por el dominio MHYT.....</b>	<b>47</b>
<b>8. DISCUSION.....</b>	<b>52</b>
<b>9. CONCLUSION.....</b>	<b>55</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

*Azospirillum baldaniorum* Sp245 es una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas, puede formar biopelículas a través de un proceso controlado por el segundo mensajero: el ácido di (3'-5') guanosin monofosfato (diGMPc). En el genoma de *A. baldaniorum* están codificadas una amplia variedad de proteínas potencialmente involucradas en el control de la concentración intracelular del diGMPc, muchas de las cuales están acopladas a dominios sensoriales que podrían estar involucrados en el establecimiento de una relación mutualista con el hospedero. En este trabajo, se presenta el análisis *in silico* y la caracterización funcional del gen *cdgB* (AZOBR\_p410089), que codifica para una proteína multidominio MHYT-PAS-GGDEF-EAL de *A. baldaniorum* Sp245. CdgB se comporta predominantemente como una fosfodiesterasa específica de diGMPc en *A. baldaniorum* Sp245, ya que inhibe la formación de biopelícula, la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y promueve la motilidad natatoria. Sin embargo, una variante de CdgB mutada en el dominio EAL se comporta como diguanilato ciclasa (DGC), sugiriendo que CdgB posee actividad dual. Distintas cepas con alteraciones en el dominio DGC y el dominio MHYT afectan la inhibición de la producción de EPS y la inducción de la motilidad natatoria. Sorprendentemente, se observó que la sobreproducción de CdgB resulta en un aumento en la acumulación del diGMPc en el sistema heterólogo de *Escherichia coli*, lo que sugiere bajo ciertas condiciones que CdgB puede comportarse predominantemente como una DGC. Además, también se demostró que CdgB está anclada a la membrana celular y se localiza predominantemente en los polos de la célula. Ésta presunta localización depende de la presencia del dominio MHYT. En resumen, nuestros resultados sugieren que CdgB podría influir sobre mecanismos de señalización que controlan los estilos de vida móvil y sésil en respuesta a señales ambientales en donde se desarrolla normalmente *A. baldaniorum* Sp245.

## SUMMARY

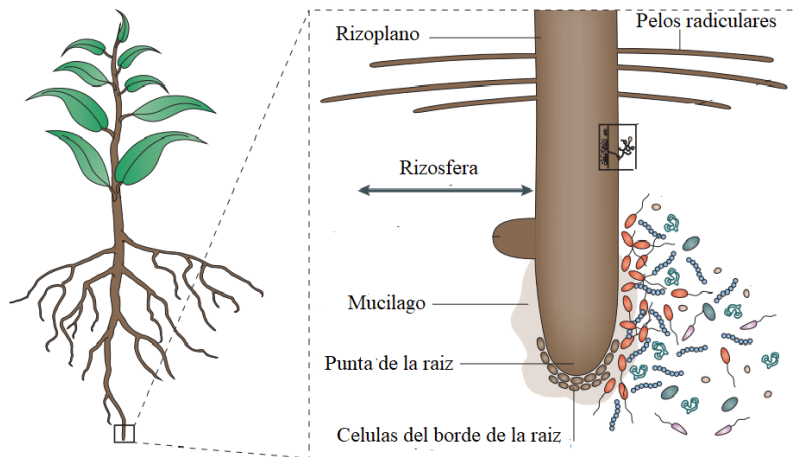
*Azospirillum baldaniorum* Sp245, a plant growth-promoting rhizobacterium, can form biofilms through a process controlled by the second messenger cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP). *A. baldaniorum* has a variety of proteins potentially involved in controlling the turnover of c-di-GMP many of which are coupled to sensory domains that could be involved in establishing a mutualistic relationship with the host. Here, we present in silico analysis and experimental characterization of the function of CdgB (AZOBR\_p410089), a predicted MHYT-PAS-GGDEF-EAL multidomain protein from *A. baldaniorum* Sp245. CdgB behaves predominantly as a c-di-GMP phosphodiesterase (PDE) in *A. baldaniorum* Sp245, it inhibits biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production and promotes swimming motility. However, a CdgB variant with a degenerate PDE domain behaves as diguanylate cyclase (DGC). This strongly suggest that CdgB is capable of dual activity. Variants with alterations in the DGC domain and the MHYT domain affect inhibition of EPS production and induction of swimming motility. Surprisingly, we observed that overproduction of CdgB results in increased c-di-GMP accumulation in the heterologous host *Escherichia coli*, suggesting that in certain conditions, the WT CdgB variant can behave predominantly as a DGC. Furthermore, we also demonstrated that CdgB is anchored to the cell membrane and localizes to the cell poles. This localization is dependent on the presence of the MHYT domain. In summary, our results suggest that CdgB can provide versatility to signaling modules that control motile and sessile lifestyles in response to key environmental signals in *A. baldaniorum* Sp245.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Rizosfera

El concepto de rizosfera fue definido por primera vez por el científico alemán Hiltner, como "la zona del suelo inmediatamente adyacente a las raíces de las leguminosas que soporta altos niveles de actividad bacteriana" (Hiltner 1904). Sin embargo, esta definición se ha ido actualizando para también incluir a las regiones del suelo cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas sean influenciadas por las raíces de la planta mediante la liberación de exudados radiculares (Pinton *et al.*, 2001). Las raíces primarias, secundarias y los pelos radiculares, genéricamente son capaces de liberar cantidades significativas de exudados radiculares, dentro de los cuales se incluyen compuestos como: azúcares y polisacáridos simples (tales como arabinosa, fructuosa, glucosa, maltosa, manosa y oligosacáridos), aminoácidos (tales como arginina, asparagina, cisteína y glutamina), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, ascórbico, benzoico, ferúlico y málico) y compuestos fenólicos. Asimismo, se pueden encontrar moléculas con mayor peso molecular como flavonoides, enzimas, ácidos grasos, reguladores del crecimiento, esteroides, alcaloides, poliacetilenos, etc. De esta forma, existe una gran diversidad de estructuras químicas en los exudados de la raíz, que van desde moléculas relativamente sencillas hasta moléculas más complejas estructuralmente (Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009). Esta diversidad depende de la especie de planta, presencia de microorganismo, estatus nutricional y agua de la planta, disponibilidad de oxígeno, medio de desarrollo y otras condiciones de crecimiento (Pinton *et al.*, 2001). La rizosfera se divide en 3 secciones: 1) Endorizosfera: Tejidos de la raíz como endodermis y capas corticales; 2) Rizoplano: La superficie de la raíz donde se adhieren las partículas del suelo y microorganismos, se compone de la corteza, epidermis y una capa de polisacáridos; 3) Ectorizosfera: La porción de suelo adyacente a la raíz y que se ven influenciados por los exudados radiculares.

Dentro de la rizosfera podemos encontrar microorganismos como hongos (micorrizas) u bacterias que interactúan con la raíz de la planta (Figura 1). Las bacterias se dividen en patógenas para la planta o benéficas, perteneciendo estas últimas al grupo de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR



**Figura 1.** Esquema donde se muestra la rizosfera y su interacción con microorganismos como bacterias y hongos (micorrizas) (Modificado de Philippot *et al.*, 2013)

## 1.2 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria por sus siglas en inglés) pueden ser definidas como parte indispensable de la biota que se encuentra en la rizosfera, las cuales, crecen asociándose con la planta (hospedera) para estimular el crecimiento de estas (Bhattacharyya *et al.*, 2012). Estas bacterias pueden colonizar tanto la superficie de la raíz o el interior de la misma (bacterias endófitas) encontrando un ambiente óptimo para establecerse y promover el crecimiento de la planta (Gray & Smith, 2005). Las PGPR promueven el crecimiento de la planta mediante mecanismos directos e indirectos. La estrategia indirecta que utilizan las PGPR es la prevención del efecto negativo de bacterias patógenas a través de la competencia produciendo sustancias antagónicas, así como la producción de factores que estimulan la respuesta sistémica inducida por parte de la planta. De manera directa se encuentra la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideroforos y fitohormonas. Estos factores, junto con su potencial genético, hacen evidente la importancia de estas bacterias en el área de la agricultura (Cook, 2000).

Entre los géneros de bacterias que se encuentran dentro del grupo de las PGPR, se encuentran *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia* y *Azospirillum*, siendo este último uno de los más estudiados (De Zelicourt *et al.*, 2013).

### 1.3 Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* (subclase  $\alpha$  de las proteobacterias) ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista agrícola, ecológico y fisiológico, dado que pertenece al grupo de bacterias PGPR. Estas bacterias promueven el crecimiento de los cultivos ayudando directamente al crecimiento e indirectamente suprimen a posibles patógenos para la planta (Barahona *et al.*, 2010).

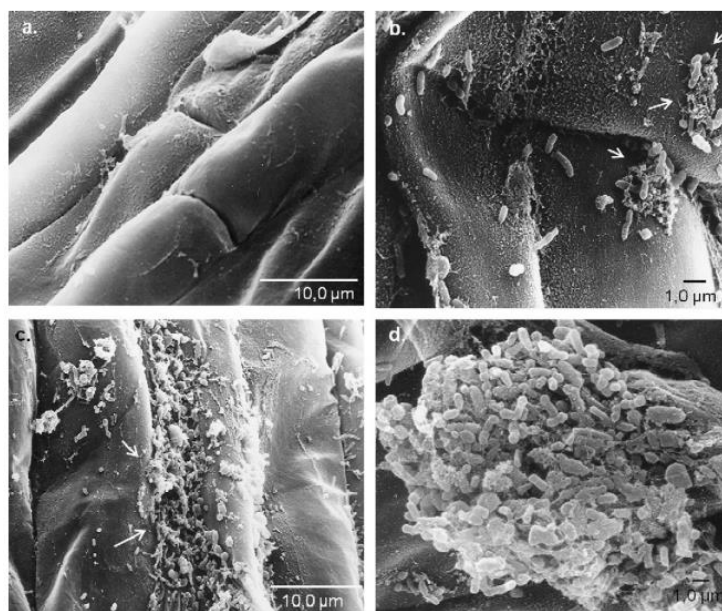
El efecto benéfico que aporta *Azospirillum* a los cultivos como cereales y gramíneas en regiones climáticas tropicales, subtropicales y templadas (Rivera, 2008) se debe a que es capaz de establecer una interacción mutualista bacteria-planta mediante mecanismos como: a) la secreción de sideróforos y fitohormonas (ácido indolacético (AIA), auxinas, giberelinas y citoquininas), lo cual ayuda al rendimiento de la planta, mejorando el crecimiento de la raíz y en consecuencia incrementando la tasa de absorción de agua y minerales, generando un incremento en el rendimiento de semillas y biomasa; b) la capacidad de fijar nitrógeno ya que puede utilizar amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular como fuente de nitrógeno (Steenhoudt y Vanderleyden 2000; Cardenas *et al.*, 2010), c) la producción de nitritos que potencian la adquisición de minerales y d) la producción de Óxido nítrico (NO), que junto con el AIA generan la promoción del crecimiento de la planta, además, de inducir la formación de biopelícula para asegurar su estancia e interacción con la planta (Molina-Favero *et al.*, 2008; Arruebarrena *et al.*, 2012). Estas son las causas por las que se le atribuye a *Azospirillum* un incremento en la producción de cultivos de 5-30% (Bashan *et al.*, 2004). La asociación de *Azospirillum* a las raíces de las plantas inducen incrementos en porcentaje y tasa de germinación; aumentos en la altura, peso fresco total, longitud radicular, mayor número de pelos radiculares, raíces adventicias y secundarias; incrementos en área foliar, repercutiendo en mayores índices de fotosíntesis y consiguiente mayor producción; incrementos en floración, espigamiento y amarre de fruto; y aumento en niveles de nitrógeno, expresados en proteína en el follaje y grano (Rueda *et al.*, 2009).

Actualmente este género comprende varias especies conocidas, entre ellas están, *A. lipoferum*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. canadense*, *A. baldaniorum* (anteriormente conocido como *A. brasilense*) etc. siendo esta última la especie más utilizada para estudiar la asociación bacteria-planta

#### **1.4 Colonización por *Azospirillum baldaniorum***

*Azospirillum baldaniorum* es una alfa proteobacteria que habita la rizosfera y promueve el crecimiento de las plantas al colonizar a las raíces, por lo que esta especie es utilizada en todo el mundo como un biofertilizante comercial (Bashan *et al.*, 2014). Es capaz de aumentar el rendimiento de cultivos importantes como cereales y gramíneas que crecen en diversos suelos y regiones climáticas (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). 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-Mata *et al.*, 2018b),

Para que *Azospirillum baldaniorum* pueda promover el crecimiento de la planta, tiene que existir una unión estable y duradera entre la bacteria y la planta. Para esto, cuando *Azospirillum* encuentra a la planta, prosigue a colonizar las raíces en dos pasos: adsorción y anclaje. En la adsorción, la bacteria se une a la raíz de forma reversible, lo cual dura dos horas, para que dentro de 8 horas *Azospirillum* comience a unirse con más fuerza a la raíz y en la hora 16 se vuelva irreversible esta unión. La adsorción se debe a la interacción de adhesinas y al flagelo polar, que son proteínas de la superficie bacteriana (Michiels *et al.*, 1991), mientras que el de anclaje se debe a la interacción de polisacáridos y sustancias poliméricas extracelulares (Camelo *et al.*, 2011). Estos pasos permitirán el posterior desarrollo de la biopelícula, la cual garantizara la permanencia de la bacteria en la planta, como lo muestra la Figura 2 (Guerrero-Molina *et al.*, 2012).



**Figura 2.- Etapas en la unión de *Azospirillum* sp. a raíces de plantas.** Micrografías electrónicas de barrido (SEM) de raíces de fresa colonizadas por *A. baldaniorum*. (A) Raíces sin bacterias. (B) Bacterias *A. baldaniorum* como células aisladas colonizando a la raíz. (C). Formación de microcolonias. (D) Formación de biopelícula (Guerrero-Molina *et al.*, 2012)

En la primera etapa de la colonización, la planta secreta exudados radiculares que contienen fuentes de carbono y nitrógeno como: azúcares, aminoácidos, compuestos fenólicos, metabolitos secundarios, polisacáridos y proteínas. Estos exudados le permiten a la planta tener una interacción con la comunidad microbiana de la rizosfera, atrayéndolos hacia ésta (Huang *et al.*, 2014). En este caso, *A. baldaniorum* es quien detecta estos exudados, iniciándose la segunda etapa en donde la bacteria exhibe un comportamiento quimiotáctico el que le permite navegar hacia las raíces de la planta (Wadhams *et al.*, 2004). Con base a la señal que detecte la bacteria se darán distintos tipos de taxis (migración hacia) como, por ejemplo: aerotaxis (gradientes de oxígeno), fototaxis (gradiente de luz), o taxis hacia aceptores de electrones alternativos, etc. *A. baldaniorum* es atraído principalmente por ácidos orgánicos (malato y succinato), azúcares (fructosa, ribosa, arabinosa y galactosa), aminoácidos (glutamato, aspartato, alanina, glutamina y asparagina) y aceptores de electrones alternativos para la respiración celular (nitrato, nitrito y DMSO) (Alexandre *et al.*, 2000).

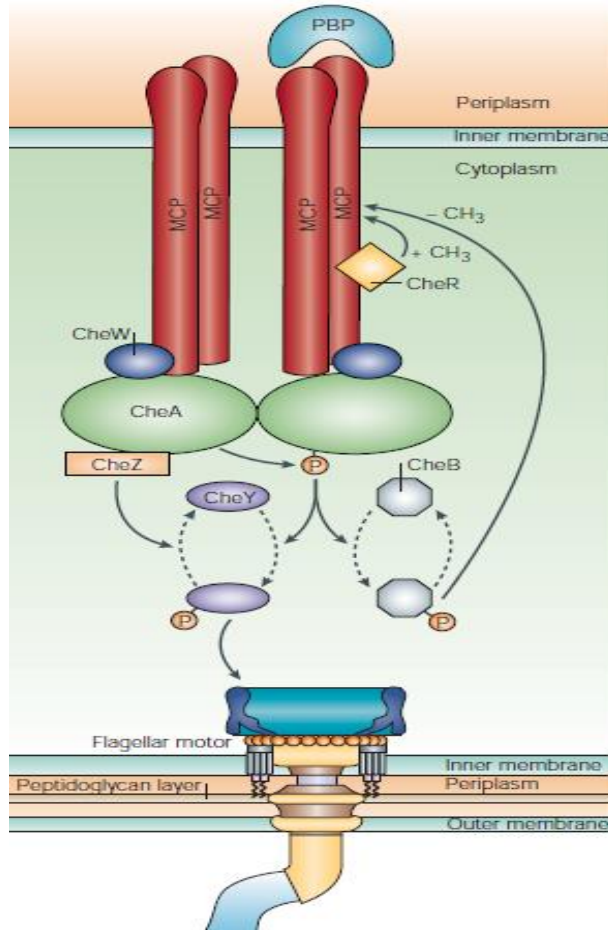
Una vez que *Azospirillum* encuentra la planta, esta prosigue a colonizar las raíces en las dos fases restantes: adsorción y anclaje. Posteriormente la bacteria se une a la raíz de

forma reversible, proceso que toma de 30 min hasta 8 h. Esta unión reversible se debe a la interacción de adhesinas y al flagelo polar, que son proteínas de la superficie bacteriana; junto con polisacáridos capsulares de la bacteria con la raíz de la planta (Levanony y Bashan, 1991; Michiels *et al.*, 1991; Rodriguez *et al.*, 2007). Posteriormente, el anclaje se da por la presencia de exopolisacáridos (EPS) (Camelo *et al.*, 2011) que están implicados en la unión célula-célula y con la superficie en donde se adhiere la célula. Una vez se lleva a cabo el anclaje, la bacteria prosigue a formar una biopelícula, que le conferirá resistencia ante las condiciones del ambiente y microorganismos competidores. De esta forma asegura su estancia y le permite generar beneficios en el crecimiento de la planta hospedera. Dentro de estas etapas, desde la colonización hasta la formación de biopelícula y la quimiotaxis pueden ser considerados los más cruciales. (Grinberg *et al.*, 2019)

### **1.5 Quimiotaxis**

La quimiotaxis bacteriana es el movimiento predominante hacia regiones donde se encuentren concentraciones altas de compuestos beneficiosos (atrayentes) y lejos de regiones con sustancias químicas tóxicas (repelentes) (Wadhams *et al.*, 2004). Este es un mecanismo importante, puesto que le permite a la bacteria moverse hacia las raíces de la planta a través de los exudados radiculares que serán la fuente de carbono y energía (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Las vías de señalización de la quimiotaxis han sido más estudiadas en bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. El movimiento comienza por los flagelos presentes en las bacterias, mismos que girarán a favor o en contra de las manecillas del reloj. Cuando se da un cambio en la dirección de contra sentido de las manecillas de reloj a uno a favor, provoca el cambio de dirección del movimiento por parte de la bacteria. Este cambio de dirección del flagelo es regulado por un sistema de doble componente, el cual está compuesto por un receptor de membrana (MCP, proteína aceptora de metilos) que se encuentra en grupos localizados en los polos de la bacteria (Gestwicki *et al.*, 2000; Underbakke *et al.*, 2010), una proteína cinasa histidínica (CheA), una proteína adaptadora (CheW), un regulador de respuesta (CheY) y dos proteínas adaptadoras CheB y CheR. La presencia de repelentes o ausencia de atrayentes resulta en el incremento en la actividad de CheA, la cual incrementa los niveles de CheY fosforilada (CheY-P). Esta última interactúa con las proteínas del motor flagelar FliM y FliN para generar el cambio de dirección del rotor. Esto se detiene mediante la acción de CheZ que actúa como fosfatasa para remover el fosfato de CheY. CheA por su lado

fosforila la metiltransferasa CheB, la cual removerá los grupos metilo de la MCP. La acción de CheB es contrarrestada por la metiltransferasa CheR. La proteína MCP con muchos grupos metilo puede activar a CheA, la cual activara a CheB. De esta forma CheB y CheR pueden generar adaptaciones permitiendo a la célula responder a cambios químicos del ambiente (Figura 3) (Hazelbauer *et al.* 2008; Wadhams *et al.* 2004).

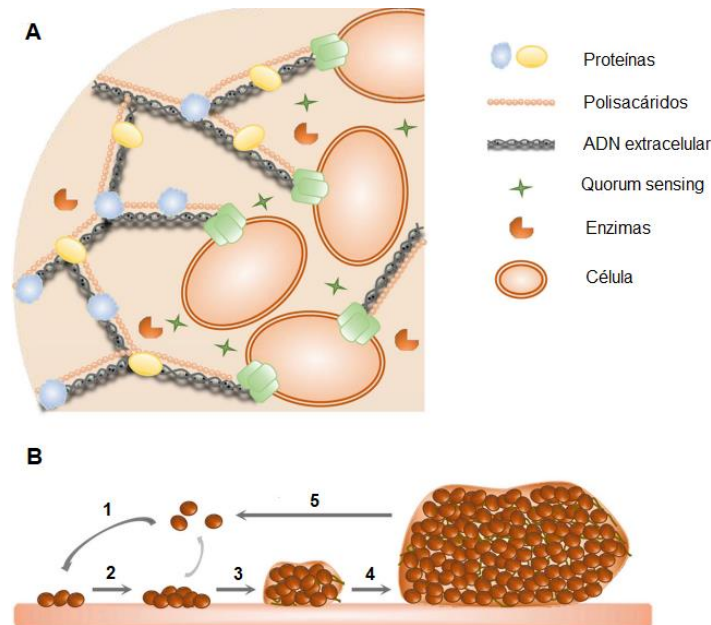


**Figura 3.- Diagrama del sistema de quimiotaxis en *E. coli* (Wadhams *et al.* 2004).**

## 1.6 Biopelícula

La biopelícula es una comunidad bacteriana creada por una o varias especies sobre una superficie biótica o abiótica. Esta estructura les confiere a las bacterias protección contra condiciones del ambiente y contra otras bacterias que compitan por el mismo nicho ecológico. La biopelícula está conformada por la unión de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), entre ellas se encuentran proteínas, polisacáridos y ADN extracelular, mismas que son secretadas por las bacterias a lo largo de su desarrollo, así como producto

de la lisis celular (Ramey *et al.*, 2004). Una vez creada esta matriz, la biopelícula conferirá protección a todas las bacterias que se encuentren embebidas en ella, asegurando su estancia en la superficie donde se generó (Figura 4). La formación de la biopelícula consta de 5 etapas: 1) La unión inicial donde participan proteínas de superficie (adhesinas), flagelos, fimbrias de tipo I, IV y Tad, así como también, polisacáridos capsulares, permitiendo a las células unirse al sustrato. 2) formación de una monocapa de células, una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una micro colonia junto con la secreción de EPS, 3) migración para formar colonias en multicapa, desarrollando una forma parecida a un hongo, 4) producción de la matriz extracelular y síntesis de los EPS para generar una estructura dinámica con canales en su interior que permiten el flujo de nutrientes, 5) maduración de la biopelícula y dispersión de las células, rompiéndose la matriz conformada por los EPS para la formación de una nueva biopelícula y de esta forma repitiendo el ciclo desde el estado de vida planctónico (Maric y Vranes 2007; Wei y Ma 2013).



**Figura 4.** Componentes (A) y etapas de formación (B) de la biopelícula. Esta estructura se construye en diferentes pasos: 1.- Unión de las bacterias a la superficie de la planta, 2.- Formación de monocapas, 3.- Formación de multicapas, 4.- Formación de estructuras tridimensionales y 5.- Maduración de la biopelícula y dispersión de células hijas (Zhang *et al.*, 2020).

Asimismo, se puede encontrar otra clase de biopelículas, también llamadas películas que no están ancladas a una superficie, sino que se encuentran en la interfase líquido-aire. La formación de la película se ha descrito para varias bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Armitano *et al.*, 2013; Armitano *et al.*, 2014; Nait *et al.*, 2014) y procede a través

de varias etapas. En las primeras etapas, aparece una capa delgada de células en la interfase aire-líquido. Esta capa se origina de células que se unen y extienden sobre la superficie líquida. En etapas posteriores, las estructuras tridimensionales se desarrollan a medida que la película crece y se engrosa, lo que resulta en la formación de arrugas (O'Toole *et al.*, 2000; Branda *et al.*, 2001). El mecanismo exacto para las etapas iniciales (es decir, como las células llegan a la superficie líquida) todavía no está bien caracterizado, sin embargo, las etapas posteriores requieren de la producción de EPS para conformar la matriz y crear a la película. (Limoli *et al.*, 2015)

Este ciclo entre estado de vida planctónico a sésil y viceversa está definido por el segundo mensajero ácido di (3'-5') guanosin monofosfato (diGMPc). (Ramírez-Mata *et al.*, 2014)

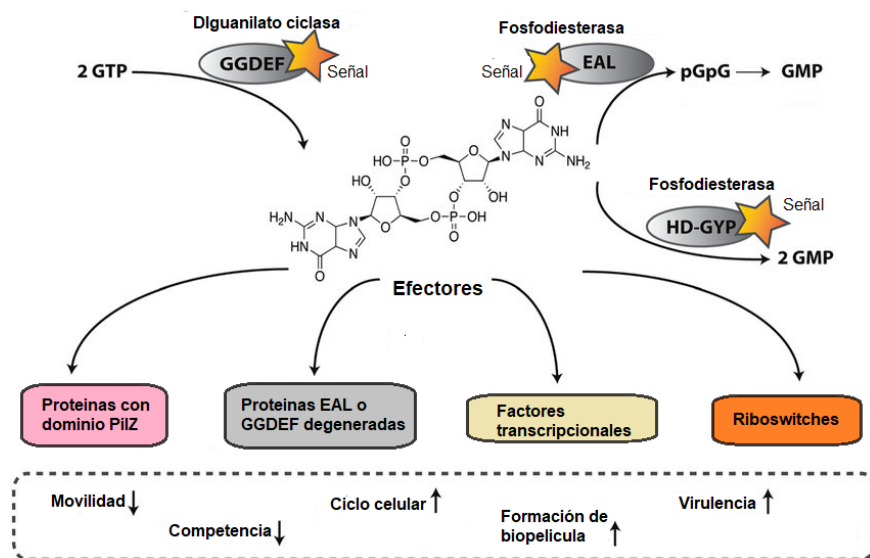
### **1.7 El segundo mensajero diGMPc**

En los últimos años, varios informes han demostrado el papel del segundo mensajero diGMPc como un regulador central en la producción de EPS, formación de biopelícula, quimiotaxis y distintos tipos de movilidad, ya sean nado, movilidad en superficie (swarming) ó twitching (Boehm *et al.*, 2010; Römling *et al.*, 2015; Russell *et al.*, 2013). Cuando la concentración intracelular de este segundo mensajero incrementa se da el estilo de vida sésil, formación de biopelícula y expresión de componentes de la matriz extracelular. Por el contrario, cuando el diGMPc disminuye se da el estilo de vida planctónico. Esto lo lleva a cabo el diGMPc a través de su interacción con efectores, como riboreguladores, factores transcripcionales o proteínas. Estos efectores tendrán la característica de poder unir al segundo mensajero mediante un dominio proteico para poder realizar su actividad (McDougald *et al.*, 2011; Römling *et al.*, 2013). Los niveles intracelulares de diGMPc se ven regulados por enzimas con actividad diguanilato ciclasa (DGC), que son proteínas con dominio GGDEF, y por fosfodiesterasas (PDE) ya sea con dominio EAL o HD-GYP (Xiqui *et al.*, 2003; Tamayo *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2006; Barahona *et al.*, 2010 y Römling *et al.*, 2013).

### **1.8 Síntesis del diGMPc por proteínas DGC**

Las proteínas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) usualmente actúan como homodímeros, donde cada monómero contribuye en la unión de una molécula GTP para posteriormente unir las mediante un enlace fosfodiéster utilizando  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como cofactores (Römling *et al.*, 2013). Estas proteínas poseen el dominio GGDEF (**Figura 5**),

que contiene varios motivos proteicos importantes que contribuyen a la actividad catalítica y a su propia regulación. En primer lugar, se encuentra el sitio activo (sitio A) quien realiza la actividad catalítica para sintetizar el diGMPc y se caracteriza por poseer el motivo de aminoácidos conservados GG (D/E) EF (Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe). Donde las dos glicinas intervienen en la unión de la molécula GTP, mientras que el tercer y cuarto aminoácido están involucrados en la catálisis y coordinación del metal, respectivamente. Por otro lado, se encuentra el sitio de inhibición (sitio I): Este sitio I consta de un motivo conservado RXXD localizado 5 nucleótidos río arriba del sitio A, el cual puede realizar un enlace con el diGMPc, inhibiendo alostéricamente la síntesis de diGMPc (Römling *et al.*, 2013).



**Figura 5. Metabolismo del diGMPc en la bacteria.** Dentro de las bacterias se encuentran proteínas con dominios GGDEF y EAL, los cuales sintetizan y degradan respectivamente al diGMPc. (Modificado de Kunz & Graumann 2020)

### 1.9 Hidrolisis del diGMPc por proteínas PDE

Las proteínas con actividad fosfodiesterasa (PDE) se dividen en 2 grupos dependiendo del dominio que posean, ya sea HD-GYP o EAL. En el primer caso el producto de la hidrólisis del diGMPc son 2 moléculas de GMP, mientras que las que poseen el dominio EAL, el producto es una molécula lineal denominada 5' fosfoguanilil-(3'-5') guanosina (pGpG). El dominio EAL consta aproximadamente de 250 residuos de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos conservados Glu-Ala-Leu encargados en la hidrólisis del diGMPc y que por lo general actúan como homodímeros. Este tipo de proteínas requieren de los cofactores

Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> para tener actividad, mientras que los iones Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> o Zn<sup>2+</sup> pueden inhibir la reacción (Römling *et al.*, 2013).

En conjunto estas proteínas DGC y PDE regulan su actividad mediante dominios de señalización citoplasmáticos, transmembranales o periplasmáticos presentes en el extremo N-terminal de la proteína (REC, PAS, CHASE, MHYT y HAMP entre otros), los cuales detectan condiciones ambientales específicas como: luz, O<sub>2</sub>, CO, NO, nutrientes, proteínas, antibióticos, etc (Galperin *et al.*, 2001; McDougald *et al.*, 2011) y generan un cambio conformacional de la proteína para activarla o inhibirla. Un ejemplo es la proteína PleD de *Caulobacter crescentus*, la cual está constituida por dos dominios REC y un dominio GGDEF, que actúa como diguanilato ciclasa, al fosforilarse en uno de sus dominios REC (Paul *et al.*, 2004; Römling *et al.*, 2013).

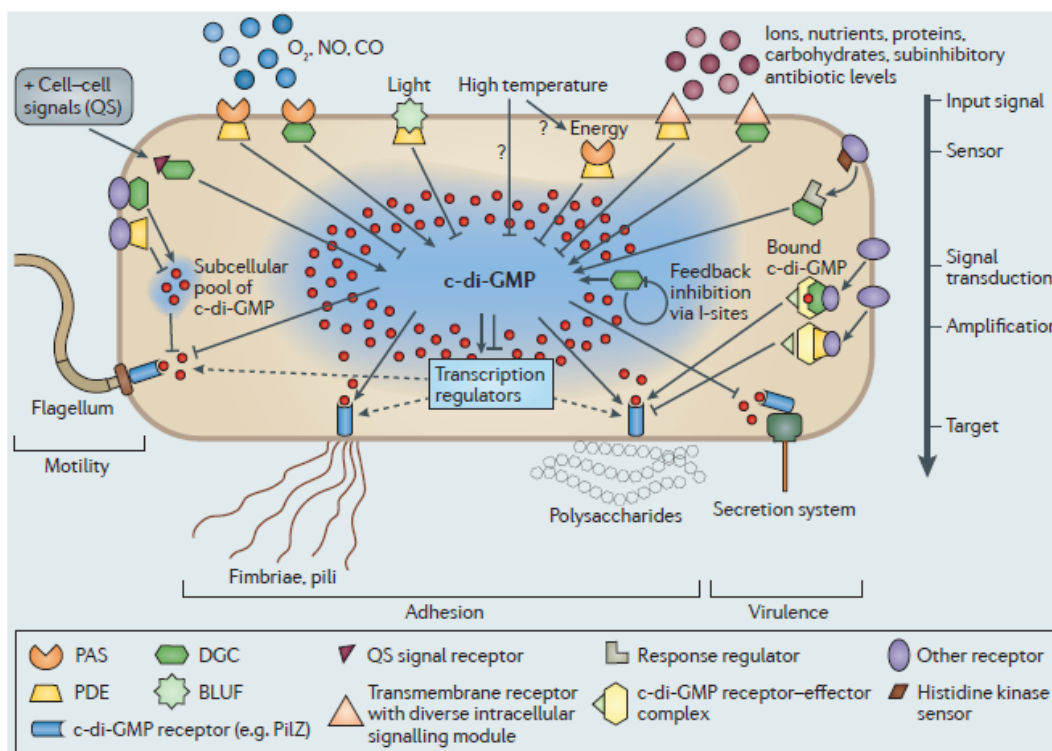
### 1.10 Proteínas híbridas

Aunque existen proteínas con un solo dominio GGDEF o EAL, también se pueden encontrar proteínas que poseen ambos dominios en la misma cadena polipeptídica, denominadas híbridas. En este caso la regulación y la actividad presente como DGC y/o PDE se complica todavía más, encontrándose 3 posibles escenarios: 1) Ambos dominios son funcionales enzimáticamente y están regulados por señales del ambiente o señales intracelulares detectadas por los dominios de señalización, conduciendo a que uno de los dos dominios permanezca activo, 2) Un solo dominio es funcionalmente activo y el otro, un dominio degenerado (cambio de uno o más aminoácidos presentes en el motivo proteico) funcionará como sitio de unión para un ligando que regularía la actividad enzimática del dominio conservado, o bien 3) que ambos dominios estén degenerados, no tendrán actividad catalítica, pero actuarían como receptores del diGMPc para continuar la cascada de señalización al interactuar con otra molécula receptora o efectora (Römling *et al.*, 2013). Ejemplos de estos casos ya han sido reportados por Pérez-Mendoza y colaboradores en el 2011 que describieron una proteína con dominio GGDEF (ECA3270) en *Pectobacterium atropiticum*, en la cual se encuentra el motivo SGDEF, presentando una substitución en el primer aminoácido glicina por una serina; aunque el dominio se encuentre parcialmente degenerado todavía presenta su actividad como DGC. Por otro lado, Navarro y colaboradores en el 2009 demuestran la función como receptor de diGMPc en una proteína híbrida FimX en *P. aeruginosa*. Ambos dominios están degenerados y por tanto inactivos.

La proteína pierde su función como DGC y PDE, pero este último dominio tiene una alta afinidad por el diGMPc.

### 1.11 Posas del diGMPc

Es necesario hacer mención en como el diGMPc se encuentra distribuido en la célula. Hay reportes (Christen *et al.*, 2010; McDougald *et al.*, 2011; Petchiappan *et al.*, 2020) que proponen la existencia de una poza global de diGMPc encargada en la interacción con la mayoría de efectores para poder regular los cambios fisiológicos en las bacterias. Sin embargo, también se encuentran pozas sub celulares donde proteínas DGC y/o PDE con domino único o híbridas interactúan con efectores específicos que estén cercanos. Estas pozas de diGMPc se pueden localizar comúnmente cercanas a la membrana citoplasmática, y de esta forma regular procesos específicos dentro de la bacteria otorgándole una mayor versatilidad. Se propone que de esta forma la bacteria pudiera responder más rápidamente ante las condiciones ambientales al no depender únicamente de la poza global de diGMPc (McDougald *et al.*, 2011) (Figura 6)



**Figura 6. Regulación mediada por el diGMPc.** La regulación mediada por el diGMPc se lleva a cabo en 2 niveles: 1) Una poza general encargada en la regulación de la mayoría de los procesos fenotípicos y 2) Pozas sub celulares encargadas en la regulación de procesos específicos. Tomado de McDougald *et al.*, 2011.

Por ejemplo, la proteína híbrida MucR, compuesta por los dominios MHYT, GGDEF y EAL cuenta ambas actividades DGC y PDE. El dominio MHYT, se propone que es capaz de detectar el Óxido Nítrico (NO) para regular la producción de diGMPc a través de los dominios con actividad catalítica. A su vez, MucR podría interactuar con la proteína aledaña Alg44, responsable en la síntesis del polisacárido alginato en *P. aeruginosa*, en función a la posa de diGMPc controlada por MucR (Wang *et al.*, 2009 y Hay *et al.*, 2009) (Figura 7).

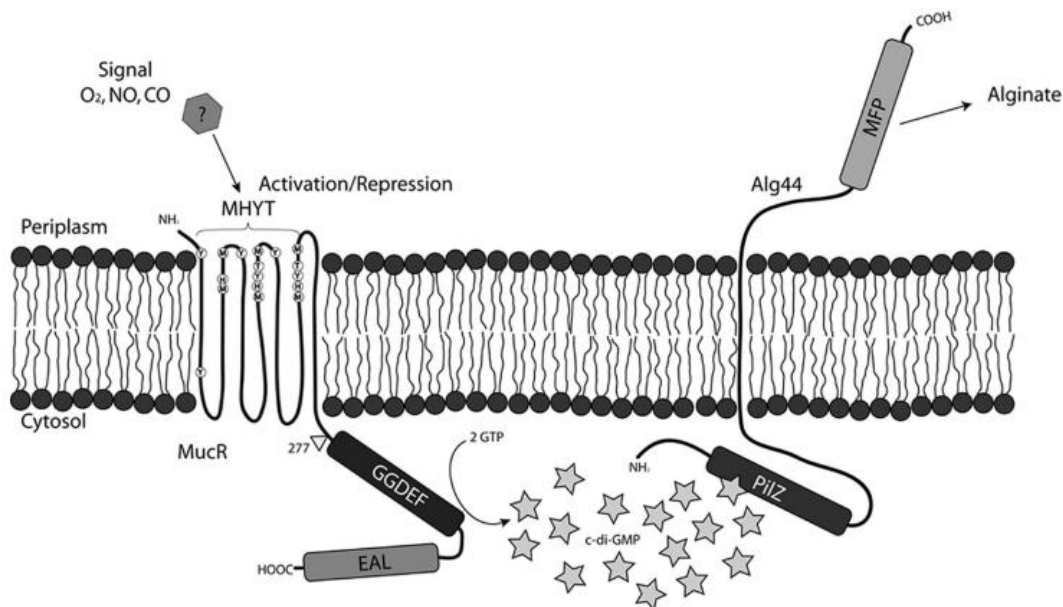


Figura 7. Modelo propuesto por Hay y colaboradores en el 2009 de la biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* regulado por MucR.

## 2 ANTECEDENTES

En el laboratorio de la Interacción Bacteria-Planta del CICM ICUAP, se realizaron análisis bioinformáticos del genoma de *A. brasilense* Sp245 (Reclasificada actualmente como *A. badaniorum*) con los cuales se pudo identificar genes presuntivos que codifican para proteínas con dominios GGDEF, EAL, GGDEF-EAL, encontrando 35 proteínas en total, de las cuales 20 de estas solo cuentan con el dominio GGDEF, 5 con EAL y los 10 restantes corresponden a proteínas híbridas. Entre las cuales se encuentra AZOBR\_410089 (*cdgB*) que codifica a la proteína híbrida CdgB (Ramírez-Mata *et al.*, 2018a)

Cruz-Pérez en el 2019 demostró por RT-PCR que el gen *cdgB* se expresa constantemente tanto en condiciones planctónicas como en formación de biopelícula, por lo que dicho gen puede desempeñar un papel en ambos fenotipos.

Acatitla-Jácome en el 2019 genera la cepa mutante por eliminación del dominio MHYT de la proteína CdgB (PMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>). Posteriormente comprueba el cambio del tamaño de la proteína mediante ensayos por Western Blot.

### 3 JUSTIFICACION

La constante necesidad en mejorar el rendimiento de los cultivos con importancia económica hace fundamental la búsqueda de nuevas alternativas que sean eficientes y amigables con el ambiente. Esto convierte a *Azospirillum baldaniorum* en un microorganismo idóneo para su estudio, al ser capaz de promover el crecimiento de las plantas que coloniza y poder reducir el uso de fertilizantes químicos que ocasionan efectos nocivos en el suelo, agua y salud. Por lo anteriormente mencionado es importante desarrollar conocimiento científico con respecto a los procesos fisiológicos y bioquímicos implicados en la promoción del crecimiento. El estudio enfocado de las vías de señalización de *A. baldaniorum* nos permitirá optimizar, y si es posible, mejorar el rendimiento de la bacteria con respecto a su promoción en el crecimiento de la planta.

Es así, que nos propusimos estudiar la actividad de la proteína híbrida CdgB junto con su localización celular en *A. baldaniorum* Sp245

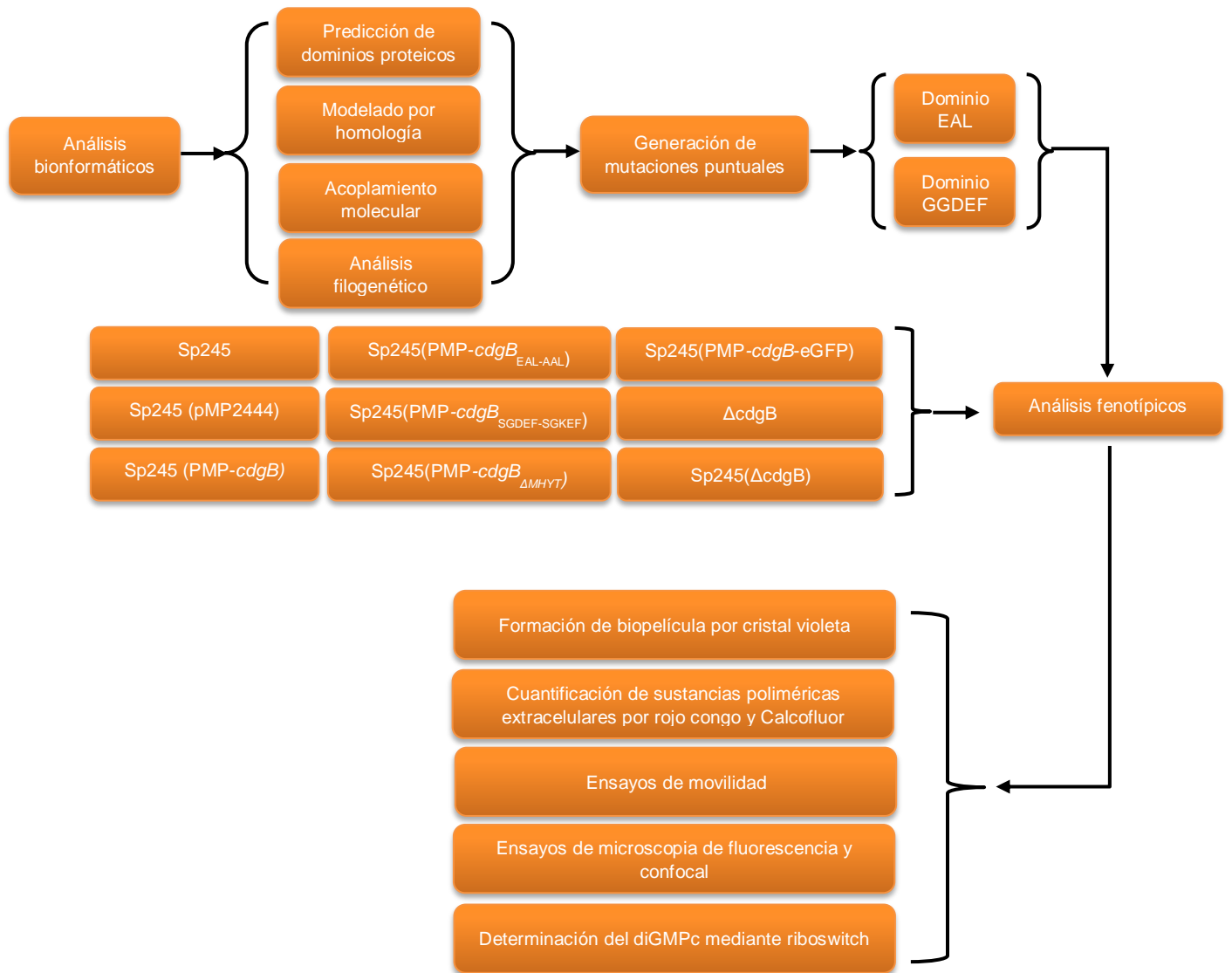
## 4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la probable función DGC y/o PDE de CdgB, así como determinar su localización celular en *A. baldaniorum* Sp245.

### 4,1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la arquitectura de la proteína CdgB a través de análisis bioinformáticos.
- Explorar in silico la posible función como DGC y/o PDE de la proteína CdgB.
- Generar la mutante por eliminación del gen *cdgB* ( $\Delta cdgB$ ).
- Generar la cepa sobreexpresada de la proteína CdgB.
- Realizar mutaciones puntuales en los motivos GGDEF y EAL para evaluar su funcionalidad.
- Evaluar los fenotipos de curvas de crecimiento, biopelícula, producción de SPE y movilidad entre las cepas silvestre, mutantes y sobreexpresada,
- Analizar el efecto de CdgB sobre la acumulación del di-GMPc intracelular
- Identificar la localización celular de la proteína CdgB.
- Evaluar la participación del dominio MHYT en la localización de la proteína.

## 5 DIAGRAMA DE TRABAJO



## 6 MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Material biológico

El material biológico, así como los plásmidos y cebadores empleados para el proyecto se describen en las Tablas 1, 2 y 3.

Cepas	Genotipo o Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>fhA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> ) U169 <i>phoA glnV44</i> $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> ) M15 <i>gyrA96 recA1 thi-1 hsdR17</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>recA, thi, pro, hsdR-M</i> + RP4-2-Tc::Mu::Km:Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pGEX	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1 que contiene el vector pGEX-4T-1 y el biosensor pDZ-119 específico para el diGMPc	Sierra-Cacho <i>et al.</i> , 2021
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pQE-Cd	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1 que contiene el vector pLIL-2 y el biosensor pDZ-119	Sierra-Cacho <i>et al.</i> , 2021
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ-119 pGEX-Cdg	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1 que contiene el vector pGEX-CdgB y el biosensor pDZ-119	Este proyecto
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani <i>et al.</i> , 2004
Sp245 (pMP2444)	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP2444	Este proyecto
$\Delta$ <i>cdgB</i>	Mutante isogénica $\Delta$ <i>cdgB</i> ::Km <sup>R</sup> de Sp245	Este proyecto
$\Delta$ <i>cdgB</i> (pMP2444)	Derivado de $\Delta$ <i>cdgB</i> que posee el plásmido pMP2444	Este proyecto
$\Delta$ <i>cdgB</i> (pMP- <i>cdgB</i> )	Derivado de $\Delta$ <i>cdgB</i> con el plásmido pMP- <i>cdgB</i> sobreexpresando a <i>cdgB</i>	Este proyecto
Sp245 (pMP- <i>cdgB</i> -eGFP)	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP- <i>cdgB</i> - <i>egfp</i> , el cual contiene la fusión traduccional <i>cdgB</i> -eGFP	Este proyecto
Sp245 (pMP- <i>cdgB</i> )	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP- <i>cdgB</i> sobreexpresando a <i>cdgB</i>	Este proyecto
Sp245 (pMP- <i>cdgB</i> <sub><math>\Delta</math>MHYT</sub> )	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP- <i>cdgB</i> <sub><math>\Delta</math>MHYT</sub> con el dominio MHYT eliminado	Este proyecto
Sp245 (pMP- <i>cdgB</i> <sub>SGDEF-SGKEF</sub> )	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP- <i>cdgB</i> <sub>SGDEF-SGKEF</sub> con la mutación puntual dirigida al dominio GGDEF.	Este proyecto

Sp245 (pMP- <i>cdgB</i> <sub>EAL-AAL</sub> )	Cepa Sp245 que posee el plásmido pMP- <i>cdgB</i> <sub>EAL-AAL</sub> con la mutación puntual dirigida al dominio EAL	Este proyecto
--	--	---------------

**Tabla 1.-** Cepas utilizadas en el proyecto.

Plásmidos	Genotipo o Fenotipo	Referencia
pGEM-TEasy Vector	Vector de clonación f1 <i>ori, ori, ApR, lacZ<math>\alpha</math></i> , Promoter: <i>T7, lac, SP6</i>	Promega
pGEM- <i>cdgB</i>	pGEM-TEasy con el gen <i>cdgB</i>	Este proyecto
pGEM- <i>cdgB-egfp</i>	pGEM-TEasy con la fusión traduccional <i>cdgB::egfp</i>	Este proyecto
pMP2444	Vector de amplio rango de hospedero que posee a eGFP (Proteína verde fluorescente potenciada) y Gm <sup>R</sup>	Bloemberg <i>et al.</i> , 2000
pGEX-4T-1	Vector de expresión, promotor tac, etiqueta GST, ApR	Promega
pDZ-119	Biosensor específico de diGMPc, CmR	Martinez-Méndez <i>et al.</i> , 2021
pGEX- <i>cdgB</i>	Plásmido derivado de pGEX-4T-1 que posee el ORF del gen <i>cdgB</i> gene, ApR	Este proyecto
pGEX- <i>cdgB</i> <sub>SGDEF-SGKEF</sub>	Derivado de pGEX-4T-1 donde se reemplazó el ácido aspártico por lisina en el dominio GGDEF (SGDEF a SGKEF) de CdgB	Este proyecto
pGEX- <i>cdgB</i> <sub>EAL-AAL</sub>	Derivado de pGEX-4T-1 donde se reemplazó el ácido glutámico por alanina en el dominio EAL (EAL a AAL) de CdgB	Este proyecto
pMP- <i>cdgB-egfp</i>	Derivado de pMP2444 con la fusión traduccional <i>cdgB-eGFP</i>	Este proyecto
pMP- <i>cdgB</i>	Derivado de pMP2444 que posee al gene <i>cdgB</i> , eGFP y un puente espaciador de 45 pb entre ellos.	Este proyecto
pMP- <i>cdgB</i> <sub><math>\Delta</math>MHYT</sub>	Derivado de pMP- <i>cdgB</i> que posee una deleción de 806bp de MHYT- <i>cdgB</i>	Este proyecto
pMP- <i>cdgB</i> <sub>SGDEF-SGKEF</sub>	Derivado de pMP- <i>cdgB</i> donde el ácido aspártico fue reemplazado por lisina sobre el motivo GGDEF (SGDEF a SGKEF) of CdgB	Este proyecto
pMP- <i>cdgB</i> <sub>EAL-AAL</sub>	Derivado de pMP- <i>cdgB</i> donde el ácido glutámico fue reemplazado por alanina sobre el motivo EAL (EAL a AAL) de CdgB	Este proyecto

**Tabla 2.-** Plásmidos utilizados en el proyecto

Cebadores	Secuencia 5´-3´	Referencia
Forf89	GAT ACC CGG GAT GCG TGT GTA TGC CTG C	Este proyecto
Rorf89	TAA GAA GTC TTC ACG CCG GCT CGT AGA AG	Este proyecto
cdgB-F-24	TCGGATCC ATCGGATCAAGCGGCGTCGA	Este proyecto
cdgB-R-24	GCCCTTGCTCACCATCGCCGGCTCGTAGAAGCGTG	Este proyecto
gfp-F-24	TTCTACGAGCCGGCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	Este proyecto
gfp-R-24	AGTCTAGA TTA CT TGTACAGCTCGTCCATGCCG	Este proyecto
cdgB-F int	GGTACCGACCGGCTGCTGCAGGAGAT	Este proyecto
gfp-ext	TACGTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	Este proyecto
cdgB-F	CAGGATCCGCCATCGTCGACCAGCGGCT	Este proyecto
cdgB-R	ACGAATTCTCACGCCGGCTCGTAGAAGC	Este proyecto
GGDEF-F	CGGCTGAGCGGCAAAGAGTTCGCCGTG	Este proyecto
GGDEF-R	CACGGCGAACTCTTTGCCGCTCAGCCG	Este proyecto
EAL-F	ATCCTGGGCTTCGCGGGCGCTGGTGCGC	Este proyecto
EAL-R	GCGCACCAGCGCCGCGAAGCCCAGGAT	Este proyecto

**Tabla 3.-** Cebadores utilizados en el proyecto

## 6.2 Metodología

### **Análisis de secuencia de la proteína, modelado de estructura y acoplamiento computacional.**

La secuencia de CdgB se analizó con las bases de datos SMART (Letunic *et al.*, 2006), Pfam (Finn *et al.*, 2006) y Protter (Omasits *et al.*, 2014) para predecir dominios funcionales y características relevantes para su localización celular.

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con las plataformas Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) y STRAP (Gille *et al.*, 2014). El modelo estructural PAS-GGDEF-EAL de CdgB para la representación esquemática fue generada con los servidores I-TASSER y SwissModel (Yang *et al.*, 2015 y Waterhouse *et al.*, 2018) tomando como referencia la estructura de RbdA (Protein Data Bank [PDB]:5XGB). Las estructuras de los dominios para los análisis de acoplamiento molecular fueron construidas con el servidor SwissModel tomando como referencia las estructuras de RbdA (Protein Data Bank [PDB] código 5XGD) (Liu *et al.*, 2018) para el dominio GGDEF y MucR ([PDB] código 5M1T) (Bellini *et al.*, 2017) para el dominio EAL, ambos de *P. aeruginosa*. La calidad de los modelos se analizó en el servidor Molprobit (Williams *et al.*, 2018) y se realizó una posterior minimización estructural en el software UCSF Chimera 1.10 (Pettersen *et al.*, 1004). Los sustratos GTP y diGMPc fueron tomados de la base de datos PubChem (Kim *et al.*, 2021), a los cuales, se les añadieron hidrógenos y se realizó una minimización estructural para cada uno en Avogadro 2.0 (Hanwell *et al.* 2012). Los archivos PDBQT se generaron con la herramienta AutodockTools, donde se agregaron las cargas de los iones  $Mg^{2+}$  con el servidor SwissModel. Los análisis de acoplamiento molecular se realizaron en la plataforma AutoDockTool4 (Morris *et al.* 2009). Finalmente, se realizó la visualización y elaboración de figuras en el programa UCSF Quimera 1.10.

**Medios y condiciones de crecimiento.** Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37 °C en medio LB, y se añadió agar (1,5% p/v) para medio sólido. Se añadieron antibióticos, cuando fue necesario, a las siguientes concentraciones: ampicilina (Ap), 100 µg/ml; cloranfenicol (Cm), 50µg/mL; gentamicina (Gm), 15 µg/m. Las cepas de *A. baldaniorum* Sp245 se cultivaron en medio mínimo de K-malato, medio mínimo de lactato K320, medio rojo congo (CR), medio LB\* (2,5 mM  $MgCl_2$  y 2,5 mM  $CaCl_2$ ) o medio NFB\* (Sierra-Cacho *et al.*, 2021). Para las placas de agar (agar 1,5% p/v) se añadieron Gm 30 µg/m para la selección de plásmidos.

**Construcción de plásmidos y cepas derivadas.** La extracción de ADN genómico y plasmídico utilizados para las digestiones con enzimas de restricción, el análisis electroforético de agarosa y los ensayos de transformación se realizaron de acuerdo con los protocolos estándar (Green *et al.*, 2012).

La construcción para la sobreexpresión de *cdgB* se generó utilizando el plásmido pMP2444 de amplio rango de hospedero y alto número de copias como punto de partida (Bloemberg *et al.*, 2000). El gen *cdgB* junto con su promotor nativo fue amplificado utilizando los iniciadores Forf89 y Rorf89, posteriormente clonado en pGEM-TEasy obteniendo la construcción pGEM-*cdgB*. Los plásmidos pGEM-*cdgB* y pMP2444 fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR*I. Los fragmentos digeridos por *EcoR*I correspondientes a *cdgB* y pMP2444 linealizados fueron ligados para generar pMP-*cdgB*. La orientación deseada de 5'-3' del inserto fue confirmada por análisis de restricción con *Hind*III. El plásmido pMP-*cdgB* se transformó en *E. coli* S17.1 y después se transfirió por conjugación a *A. baldaniorum* Sp245 para producir la cepa con la sobreexpresión de CdgB, Sp245(pMP-*cdgB*).

La mutación puntual sobre el motivo GGDEF (D456K) se introdujo mediante una PCR invertida utilizando el kit de mutagénesis dirigida Q5 (New England BioLabs) siguiendo las instrucciones del fabricante (utilizando el par de iniciadores GGDEF-F y GGDEF-R). El plásmido pMP-*cdgBSGDEF-SGKEF* resultante se introdujo en *E. coli* S17.1 y posteriormente se transfirió a *A. baldaniorum* Sp245 por conjugación biparental. La misma estrategia se empleó para generar la mutación puntual sobre el motivo EAL (E580A) (utilizando los primers EAL-F y EAL-R). El plásmido pMP-*cdgBEAL-AAL* resultante se introdujo en *E. coli* S17.1 y posteriormente se transfirió a *A. baldaniorum* Sp245 por conjugación.

Todos los plásmidos generados fueron secuenciados para confirmar la secuencia correcta de *cdgB* y su orientación deseada (bajo el control del promotor lac). Dado que el plásmido pMP2444 no posee el gen que expresa al inhibidor del promotor lac, el gen *cdgB* se verá expresado constitutivamente.

Para generar la fusión traduccional *cdgB*-eGFP se utilizó un PCR por fusión diseñado por Yang *et al.* 2004. Brevemente, el gen *cdgB*, sin codón de terminación, se amplificó con los iniciadores *cdgB*-F-24 y *cdgB*-R-24. Por otro lado, el gen eGFP se amplificó utilizando los iniciadores *gfp*-F-24 y *gfp*-R-24. Los iniciadores *cdgB*-R-24 y *gfp*-F-24 generaron secuencias en los amplicones *cdgB* y eGFP que permitieran hibridarse entre sí. De esta

forma, mediante un segundo PCR utilizando los iniciadores *cdgB*-F-24 y *gfp*-R-24 se generó la fusión entre los genes. El producto de PCR fusionado y el plásmido pMP2444 se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Xba*I, y se ligaron para generar el plásmido pMP-*cdgB*-eGFP. Este plásmido fue secuenciado para confirmar la secuencia correcta de fusión *cdgB*-eGFP. Al final, este plásmido fue transferido por transformación en células competentes *E. coli* S17.1. y después fue transferido por conjugación a *A. baldaniorum* Sp245 como se describió anteriormente (Ramírez-Mata *et al.*, 2018b).

El dominio MHYT se eliminó digiriendo la construcción pMP-*cdgB*-*egfp* con *Sal*I. El fragmento digerido de 7113 pb que carece del dominio MHYT, fue ligado para producir el plásmido pMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>, que se transformó en *E. coli* S17.1. El plásmido fue transferido por conjugación a *A. baldaniorum* Sp245. Esta construcción se secuenció para corroborar que no se viera afectado el marco de lectura del gen.

Para generar la construcción pGEX-*cdgB*, el gen *cdgB* fue amplificado por PCR utilizando los iniciadores *BcdgB*-F y *EcdgB*-R e insertado en el plásmido pGEM-TEasy obteniendo la construcción pGEM-*cdgB*-2. Los plásmidos pGEM-*cdgB*-2 y pGEX-4T1 fueron digeridos con las enzimas *Bam*H1 y *Eco*R1, el fragmento digerido que contenía a *cdgB* fue ligado al plásmido linealizado pGEX-4T1 para generar pGEX-*cdgB*. La secuencia del inserto se analizó mediante secuenciación de Sanger. El plásmido pGEX-*cdgB* se transformó en células competentes de *E. coli* S17.1 que albergan el biosensor diGMPc pDZ-119 (Martínez-Méndez *et al.*, 2021).

**Análisis de curvas de crecimiento.** Para evaluar el posible efecto del plásmido pMP-*cdgB* o la mutante  $\Delta$ *cdgB* sobre el crecimiento de las bacterias. Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas variantes, comparándolas con Sp245 o cepas que albergaban al vector vacío PMP2444. Los cultivos que crecieron toda la noche, se diluyeron hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.01 en frascos Erlenmeyer (3 réplicas) que contenían 25 mL de medio NFB\* complementado con Gm, cuando fuese necesario. Los cultivos fueron crecidos en agitación (150 r.p.m) a 30°C y se midió su DO<sub>600nm</sub> cada 2 horas.

**Ensayo de formación de biopelícula.** El ensayo de formación de biopelículas se realizó como se describió anteriormente (Ramírez-Mata *et al.*, 2016; Arruebarrena *et al.*, 2013 y Jijón-Moreno *et al.*, 2019). Brevemente, la cepa Sp245 y derivadas: Sp245(pMP2444),  $\Delta$ *cdgB*,  $\Delta$ *cdgB*(PMP2444),  $\Delta$ *cdgB*(PMP-*cdgB*), Sp245(PMP-*cdgB*), Sp245(PMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>), Sp245(PMP-*cdgB*<sub>SGDEF-SGKEF</sub>) y Sp245(PMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>) se cultivaron durante

la noche a 30 °C en medio LB\*. A continuación, se inocularon 7,5 ml de medio NFB\* complementado con KNO<sub>3</sub>, en tubos de fondo redondo de borosilicato con 75 µL de cultivo con una DO<sub>600</sub> de 2. Después de la inoculación, los cultivos se incubaron durante 5 días a 30 °C en condiciones estáticas. Las biopelículas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0,5% (peso/volumen) durante 30 min y luego se lavaron con agua destilada. El cristal violeta unido se solubilizó con 2 ml de ácido acético al 33% (v/v), y la concentración de cristal violeta se determinó utilizando placas de microensayo de 96 pocillos leídas en un espectrofotómetro de microplacas EON (BioTek, Winooski, VT, USA) a 595nm. Las mediciones del cristal violeta se normalizaron mediante la concentración total de proteínas cuantificadas con el método de Bradford. Los valores son el resultado de tres experimentos independientes con tres determinaciones biológicas.

### **Determinación de la producción de sustancia polimérica extracelular**

Para analizar la producción de las Sustancias Poliméricas Extracelulares se cultivaron las cepas de *A. baldaniorum* y sus derivadas en medio LB\*, se diluyeron para obtener suspensiones bacterianas con una D.O<sub>600nm</sub> de 1.2 a 1.4 en medio NFB\* complementado con KNO<sub>3</sub> y cultivado durante 5 días a 30°C, en condiciones estáticas. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 10.000 g, los gránulos se suspendieron en medios NFB\* de 1 ml, como se describió anteriormente, y se agregó una solución colorante de rojo congo (CR) al 0,005% (p/v) (Sigma-Aldrich, Chemical) para lograr una concentración de 40 µg/ml. Las células se incubaron con agitación (200 rpm) durante dos horas. Posteriormente, la RC unida a las células se cuantificó como se describió anteriormente (Ramírez-Mata *et al.*, 2016 y Cruz-Pérez *et al.*, 2021). Las mediciones de RC se normalizaron mediante la concentración total de proteínas determinadas con el método de Bradford. Los valores son el resultado de tres ensayos independientes con tres determinaciones biológicas.

### **Ensayo de motilidad.**

El ensayo de movilidad se realizó como se describió anteriormente (Cruz-Pérez *et al.*, 2021 y Alexandre, 2010). Brevemente, 5 µL de bacterias crecidas en medio LB\* a 30 °C hasta alcanzar entre 5x10<sup>6</sup> y 5x10<sup>7</sup> UFC/ml fueron inoculadas en medio semisólido mínimo K complementado con malato, succinato o prolina (10 mM) como fuente de carbono y que contiene 0,25% (p/v) de agar. El tamaño del anillo de movilidad se midió en cm después de un crecimiento de 48h a 30 °C.

**Cuantificación relativa de la acumulación de diGMPc utilizando un biosensor.** Los niveles de diGMPc fueron analizados a través de la fluorescencia utilizando un sistema de riboswitch como describen Zhou *et al.*, 2016; Sierra-Cacho *et al.*, 2021. Las construcciones pGEX-CdgB, pQE-CdgA (control positivo) (Ramírez-Mata *et al.*, 2016) y el vector vacío pGEX-4T-1 (control negativo) se movilizaron independientemente por transformación a células competentes de *E. coli* S17.1, las cuales ya poseían el plásmido pDZ-119 (Martínez-Méndez *et al.*, 2021). Todas las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB a 30° a un OD<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0.6. Posteriormente, se añadió 0,1 mM de IPTG a los cultivos bacterianos, se incubaron durante 24h para la inducción de la expresión de proteínas. Los cultivos se concentraron 10 veces y se resuspendieron en agua. La producción de diGMPc se analizó macroscópicamente relacionando la intensidad de la fluorescencia del color con la producción del segundo mensajero. La evaluación microscópica del diGMPc se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000U. Una gota del cultivo inducido se depositó en una cubierta y se cubrió con una almohadilla de agarosa al 1%. La excitación y emisión del calibrador fluoróforo AmCyan se registraron a 457 y 520nm, respectivamente. El fluoróforo reportero TurboRFP se excitó a 553 nm, mientras que su emisión se midió a 574 nm. Las imágenes obtenidas fueron editadas con el software Nikon NIS Elements.

### **Ensayos de microscopía.**

Se visualizaron las bacterias mediante fluorescencia y microscopía confocal utilizando el escáner láser (CLSM), la cepa Sp245 y sus derivadas se cultivaron en 5 mL de medio NFB\* a 30 °C, con agitación (150 rpm) durante 18h. Luego, 1 ml de cada cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min, y cada pellet se suspendió en 100 µL de colorante FM4-64FX (10 µg / ml) (Thermo Fisher Scientific) en PBS y se mantuvo durante 10 min a 4 ° C para teñir la membrana citoplasmática. Se observó la fluorescencia del FM4-64FX con un microscopio (TE 2000U; Nikon, Tokio, Japón) utilizando un objetivo 100x (Plan Oil immersion) y se tomaron las fotografías con una cámara DS-QiIMc (Nikon). Después, 10µL de cada suspensión se montaron en una cubierta de vidrio y se sellaron con un tapón de agarosa al 1% (p/v). Para el video, las muestras se vieron con un microscopio de barrido láser confocal Eclipse Ti-E C2 + (Nikon) con una lente de objetivo 60X (Plan Apo VC, inmersión en agua). El eGFP se excitó a 488 nm, y su emisión de fluorescencia se capturó a 510 nm, mientras que el FM4-64FX se excitó a 565 nm y su emisión de fluorescencia se capturó a 734 nm. Las distintas secciones de las imágenes se visualizaron y procesaron utilizando el software

NIS Elements (Nikon). Las imágenes fueron editadas por el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) como se describió anteriormente (Ramírez-Mata *et al.*, 2018b).

Para visualizar las biopelículas formadas por las cepas, las bacterias se cultivaron en medio NFB\*+KNO<sub>3</sub> complementado con 85 µM de colorante Calcofluor-White (CWC) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se inocularon en placas con fondo de vidrio, FluoroDish (Fisher Scientific), a 30 °C en condiciones estáticas como se describió anteriormente (Jijón-Moreno *et al.*, 2019). Las biopelículas que se forman en las superficies de las placas se registraron después de 5 días y fueron observadas por CLMS. El CWC se excitó a 440 nm con un láser UV y su emisión se capturó a 500-520 nm. Las muestras se escanearon a una resolución de escaneo x/a de 1.024 × 1.024 píxeles. El tamaño del paso en la dirección z fue de 0,1 µm. El conjunto de imágenes se visualizó y procesaron utilizando NIS Elements y se editaron utilizando ImageJ como se describió anteriormente (Jijón-Moreno *et al.*, 2019). Este análisis permitió generar una visión tridimensional de la biopelícula a través de la medición de la intensidad de la señal. La estructura de la biopelícula se puede observar como una gráfica de superficie de intensidad, donde la intensidad de la señal representa la densidad de las sustancias poliméricas producidas.

#### **Análisis estadísticos.**

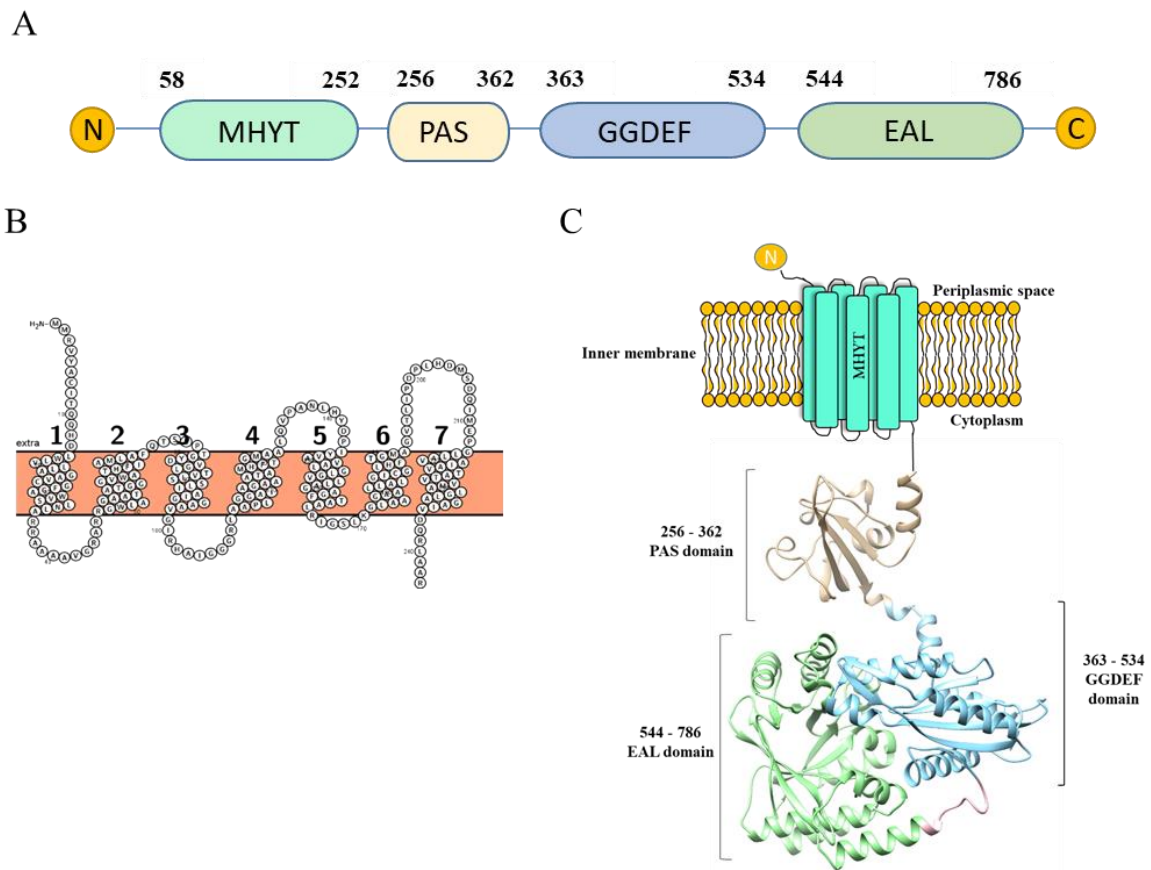
Las medias se compararon mediante la prueba t de Student para determinar diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias se consideraron significativas a valores de P inferiores a 0,05.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Análisis bioinformáticos

#### 7.1.1 La arquitectura de CdgB contiene varios dominios sensores y los dominios GGDEF y EAL.

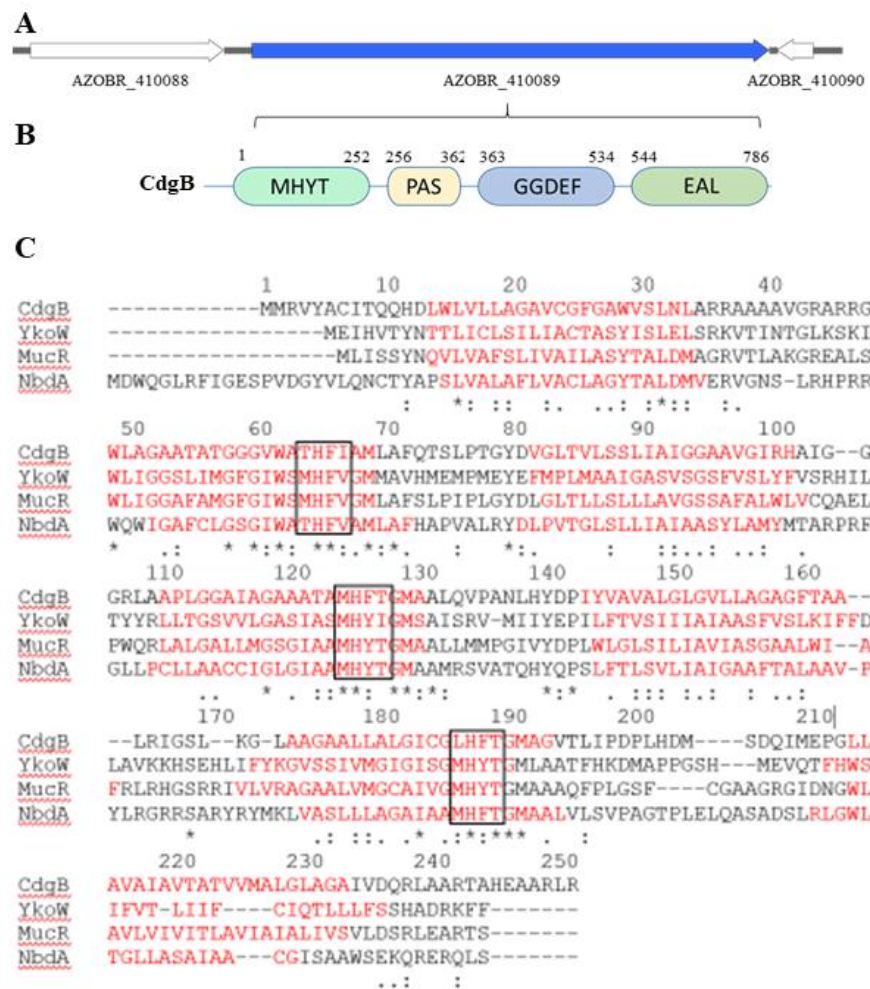
El gen *cdgB* tiene una longitud de 2385pb que codifica para una proteína de 794 aminoácidos llamada CdgB. Esta se ubica en el locus AZOBR\_p410089 del genoma de *A. baldaniorum* Sp245. De esta proteína se realizaron análisis con los programas SMART (Letunic *et al.*, 2006), Pfam (Finn *et al.*, 2006) y Protter (Omasits *et al.*, 2013) para evaluar los dominios proteicos que constituyen a CdgB, así como para predecir las regiones transmembranales que pudiera tener. Los resultados mostraron que CdgB posee 4 dominios: 1) El dominio transmembrana MHYT en la región amino terminal, 2) el dominio PAS, 3) el dominio GGDEF y 4) el dominio EAL en la región carboxilo terminal (Figura 8).



**Figura 8. Arquitectura estructural y modelado por homología de la proteína CdgB de *A. baldaniorum* Sp245.** (A) Representación esquemática de los dominios proteicos de CdgB determinados mediante la plataforma SMART. (B) Regiones transmembranales de CdgB analizadas

por la plataforma Protter. (C) Representación esquemática de la estructura 3D de CdgB donde se muestran los dominios PAS-GGDEF-EAL. El dominio transmembrana MHYT no fue integrado al análisis por modelado por homología, sin embargo, se muestra una representación esquemática dentro de la membrana citoplasmática. El dominio PAS se encuentra de color beige, el dominio GGDEF en azul y el dominio EAL en verde.

El dominio MHYT se caracteriza por ser un dominio transmembranal. De acuerdo con la literatura, se ha propuesto que puede detectar las condiciones de oxígeno, monóxido de carbono y óxido nítrico del ambiente (Galperin *et al.*, 2001 y Li *et al.*, 2013). Son 3 los motivos que posee este dominio, cada uno contiene los residuos metionina, histidina, tirosina y treonina (MHYT) localizados en las posiciones 64-67, 125-128, y 187-190 en CdgB (Figura 9). Aunado a ello, cada motivo está constituido de dos hélices transmembranales y entre ellas se encuentra la secuencia de residuos MHYT dispuestos en la región más externa de la membrana citoplasmática (Galperin *et al.*, 2001).



**Figura 9. Contexto genético y alineamiento del dominio MHYT de CdgB.** (A) Contexto genético del gen *cdgB* (AZOBR\_410089) que codifica a la proteína CdgB. (B) Representación esquemática de las estructuras de dominio de CdgB. Los números representan el aminoácido inicial y final de los dominios predichos basados en la base de datos SMART. (C) La alineación de secuencia del dominio MHYT de CdgB con otras proteínas metabolizadoras de diGMPc que albergan un dominio MHYT: la proteína YkoW de *B. subtilis*, NbdA y MucR de *P. aeruginosa*. Los tres motivos MHYT están etiquetados por cuadrados negros y las regiones transmembrana determinadas por los programas SMART y TOPCONS están resaltadas en rojo.

El dominio PAS se encuentra en el citoplasma, consta de 107 residuos ubicados en las posiciones 256 a 362 en CdgB. Este se puede encontrar en muchas proteínas de señalización bacteriana; es capaz de unir varias moléculas, como el oxígeno y el FAD; y está involucrado en la detección de la luz, es así que puede monitorear los ambientes celulares externos e internos desde la célula (Taylor *et al.*, 1999 y Qi *et al.*, 2009). A continuación, los dominios GGDEF y EAL se encuentran entre los residuos 363-534 y 544-786 de CdgB (Figura 8B). Esta distintiva arquitectura estructural y la presencia del dominio MHYT fueron las causas para el estudio de la proteína CdgB.

### 7.1.2 Modelado estructural y probable mecanismo DGC y PDE

Para analizar el mecanismo hipotético de acción como DGC y PDE, se generó la estructura del dominio GGDEF mediante modelado por homología, tomando como referencia a la proteína RbdA (entrada PDB: 5xgd; identidad 31,84%) de *P. aeruginosa* (Liu *et al.*, 2018) (Figura 10B). Después se llevaron a cabo alineamientos de secuencia de aminoácidos (Figura 10A), utilizando las plataformas Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) y STRAP (Gille *et al.*, 2014) comparándola con los dominios de las proteínas PleD y RbdA (Liu *et al.*, 2018 y Wassmann *et al.*, 2007), donde se observó que el dominio GGDEF posee los residuos involucrados en la interacción con el sustrato y cofactor conservados (GTP y Mg<sup>2+</sup>, respectivamente), al igual que PleD y RbdA, dominios ya estudiados y con actividad comprobada (Liu *et al.*, 2018 y Wassmann *et al.*, 2007). Por el contrario, en CdgB el sitio activo se encuentra parcialmente degenerado, donde la secuencia de residuos canónica GGDEF cambia a SGDEF, sin embargo, es necesario considerar que, aunque el sitio activo no esté totalmente conservado, aún puede presentar actividad de DGC, ya que este tipo de degeneración parcial ha sido reportada por otros trabajos como

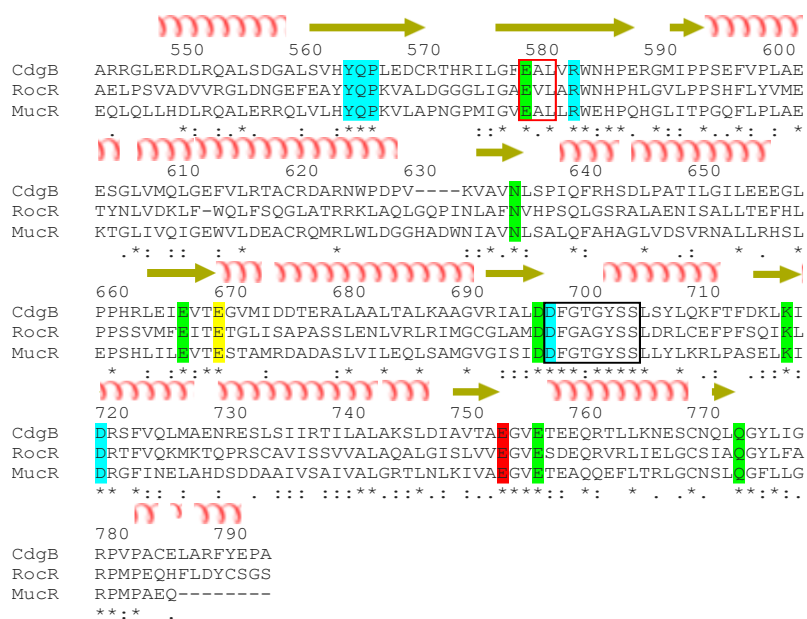
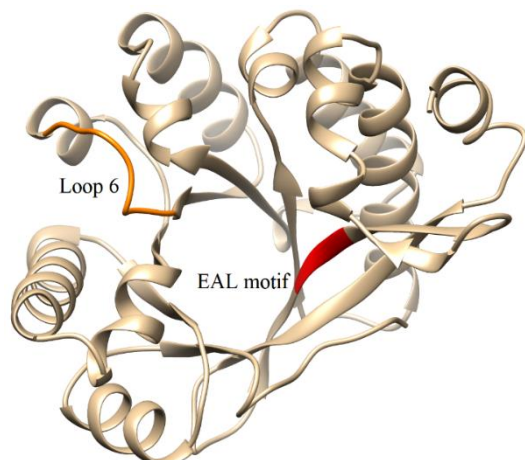
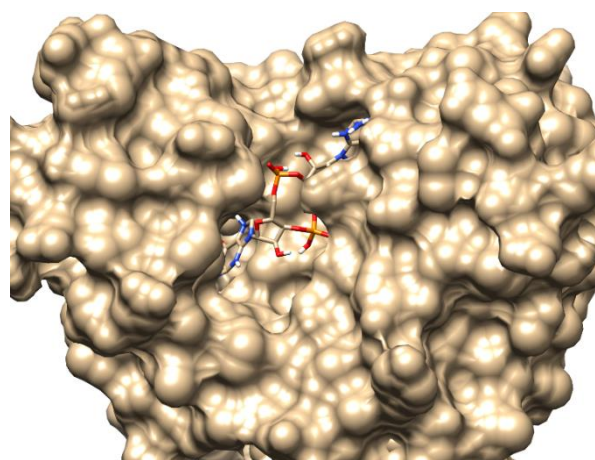
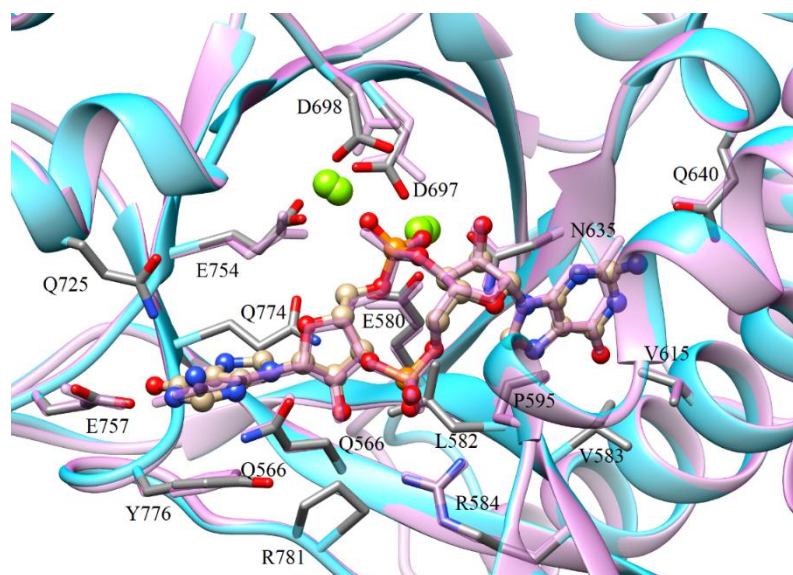
funcional (Pérez-Mendoza *et al.*, 2011; Chen y Schaap 2012; Dahlstrom y O'Toole 2017; Römling *et al.*, 2017). De la misma forma se encontró una degeneración parcial en el sitio inhibitorio, encontrando que la secuencia cambia de RXXD a PXXD, por lo tanto, lo más probable es que CdgB no se encuentre autoinhibida de manera alostérica por su producto catalítico, el diGMPc. Sin embargo, esta hipótesis tendrá que ser revisadas en estudios posteriores.

Un posterior análisis de acoplamiento molecular mostro el sitio de unión junto con la superficie de las proteínas (Figura 10C), así como la interacción hipotética entre el dominio GGDEF de CdgB y el sustrato GTP con una  $\Delta G = -8.2$  Kcal/mol (Figura 10D). Entre las interacciones predichas se observan los residuos N<sup>420</sup> y D<sup>429</sup>, como clave para la interacción con GTP, así como el residuo D<sup>455</sup>, involucrado para la unión con ion Mg<sup>+2</sup> (Liu *et al.*, 2018), que es esencial para un dominio GGDEF funcionalmente competente. Los primeros 2 residuos son importantes para la unión de guanina, mientras que D<sup>455</sup> (ubicado en el sitio activo) coordina al ion Mg<sup>+2</sup> y realiza el ataque nucleofílico sobre el alfa fosfato del GTP eliminando un pirofosfato, resultando en la formación de diGMPc a partir de otra molécula GTP (Wassmann *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2017). Estos datos sugieren que este dominio tiene una alta probabilidad de tener función de DGC.



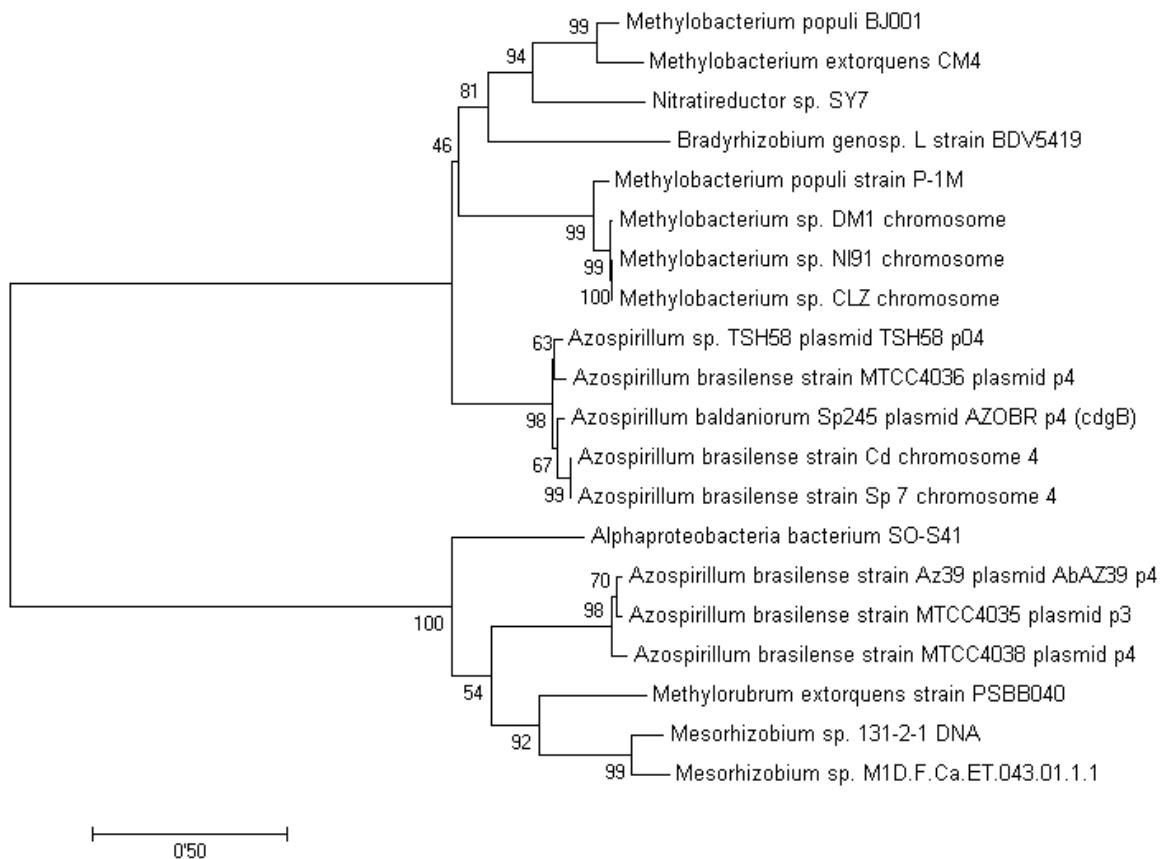
**Figura 10 Estructura del dominio GGDEF de CdgB.** (A) Alineamientos de secuencias entre el dominio GGDEF de CdgB de *A. baldaniorum* Sp245 (número de acceso GenBank CCD03171.1) con otros dominios GGDEF de estructura conocida. PleD de *C. crescentus* (número de acceso GenBank YP\_002517919.1) y RbdA de *P. aeruginosa* (número de acceso de GenBank AAG04250.1). Los elementos de la estructura secundaria se muestran encima de las secuencias. Los residuos resaltados en azul están involucrados en la interacción con el sustrato; en verde, los que interactúan con el cofactor; el sitio activo del motivo GGDEF está resaltado en cuadrado rojo, y el motivo RXXD está en cuadrado negro. (B) Modelo estructural del dominio GGDEF de CdgB generado por modelado de homología. El sitio activo GGDEF está resaltado en rojo y el sitio inhibitorio RXXD está resaltado en naranja. (C) Modelo estructural del dominio GGDEF de CdgB en complejo con el sustrato GTP mostrándose la superficie de la proteína. (D) Modelo de la interacción GGDEF/GTP generada por acoplamiento molecular con un  $\Delta G = -8,2$  Kcal/mol y superpuesta con la estructura cristalina 5XGD, correspondiente al dominio GGDEF de *P. aeruginosa* (mostrado en color púrpura claro) con un RMSD de 0,539 entre los ligandos. El ion  $Mg^{2+}$  se muestra en verde.

Por otro lado, el dominio EAL fue generado tomando como estructura molde a la proteína MucR (entrada PDB: 5m1t; identidad 45,82%) de *P. aeruginosa* (23 Bellini *et al.*, 2017) (Figura 11). El análisis de alineamiento entre las secuencias del dominio EAL de CdgB con las proteínas RocR y RbdA reveló que tiene totalmente conservado los residuos involucrados en la unión al diGMPc (Y<sup>565</sup>, Q<sup>566</sup>, P<sup>567</sup>, R<sup>584</sup>, D<sup>698</sup>, D<sup>720</sup>), a los iones  $Mg^{+2}$  (E<sup>580</sup>, N<sup>365</sup>, E<sup>667</sup>, D<sup>697</sup>, K<sup>718</sup>, E<sup>757</sup>, Q<sup>774</sup>), los residuos que componen el bucle 6 (estructura esencial para la dimerización, unión al diGMPc y cofactores) y el residuo E670, el cual otorga estabilidad al mismo bucle (Figura 11A). Adicionalmente, los análisis de acoplamiento molecular permitieron predecir el sitio de unión (Figura 11C) y la interacción entre el dominio EAL de CdgB con diGMPc con una  $\Delta G = -5.3$  kcal/mol (Figura 11D). Los resultados resaltaron a los residuos E<sup>580</sup>, E<sup>667</sup>, N<sup>635</sup> y D<sup>697</sup>, encargados de la coordinación con los iones  $Mg^{+2}$  y esenciales para el dominio EAL, ya que se ha reportado que la mutación en cualquiera de ellos afecta significativamente la actividad de PDE. Entre los aminoácidos que interactúan con el diGMPc se encuentran R<sup>584</sup> y Q<sup>566</sup>, los cuales interactúan con la guanina y el oxígeno aniónico del fosfato del diGMPc respectivamente, de esta forma estabilizando al sustrato (Rao *et al.*, 2008; Tchigvintsev *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2017). Estos datos nos permitieron sugerir que este dominio EAL tiene una alta probabilidad de ser funcional.

**A****B****C****D** $\Delta G = -8.58$  kcal/mol

**Figura 11. Estructura del dominio EAL de CdgB.** (A) Alineamientos de secuencia de aminoácidos entre el dominio EAL de CdgB de *A. baldaniorum* Sp245 (número de acceso GenBank CCD03171.1) con otros dominios EAL de estructura conocida. RocR, (número de acceso en GenBank NP\_252636.1), y MucR (número de acceso GenBank 5M1T\_A), ambas de *P. aeruginosa*. Los elementos de la estructura secundaria se muestran encima de las secuencias. Los residuos resaltados en azul están involucrados en la interacción con el sustrato. Los que interactúan con el cofactor están marcados en verde. El residuo que estabiliza estructuralmente el bucle 6 se muestra en amarillo. El residuo catalítico está en rojo. El motivo EAL está marcado con una caja roja, y el bucle 6 está dentro de una caja con contorno negro. (B) Modelo estructural del dominio EAL de CdgB generado por modelado por homología. El motivo EAL está resaltado en rojo y el bucle 6 está resaltado en naranja. (C) Modelo estructural del dominio EAL de CdgB en complejo con diGMPc mostrándose la superficie de la proteína. (D) Modelo del dominio EAL en complejo con diGMPc generado por acoplamiento molecular con una  $\Delta G = -8,58$  Kcal/mol y superpuesto con la estructura cristalográfica 5M1T, correspondiente al dominio EAL de *P. aeruginosa* (mostrado en color púrpura claro) con un RMSD de 0,757 entre ligandos. Los iones  $Mg^{2+}$  se muestran en verde.

Adicionalmente se realizó un análisis filogenético encontrando los genes homólogos a *cdgB* en la clase alfa proteobacteria (Figura 12). Se encontraron 20 ortólogos, sugiriendo que la arquitectura característica de la proteína y su potencial actividad dual DGC y/o PDE pudiera dar a estas bacterias una ventaja selectiva o la capacidad de adaptarse en función a las señales ambientales que pudieran detectar los dominios MHYT y PAS.



**Figura 12. Análisis filogenético del gen *cdgB*.** El gen *cdgB* de *A. baldaniorum* Sp245 está conservado en la clase alfa proteobacteria. Las secuencias de nucleótidos del gen *cdgB* y los genes homólogos fueron alineadas por Clustal Omega. Los archivos del árbol filogenético fueron generados por el software MEGA versión VII. El árbol filogenético se produjo utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución de Tamura-Nei, con 1000 réplicas bootstrap.

## 7.2 Análisis fenotípicos

### 7.2.1 Generación de cepas derivadas de *A. baldaniorum* para la evaluación de la actividad DGC y/o PDE en CdgB.

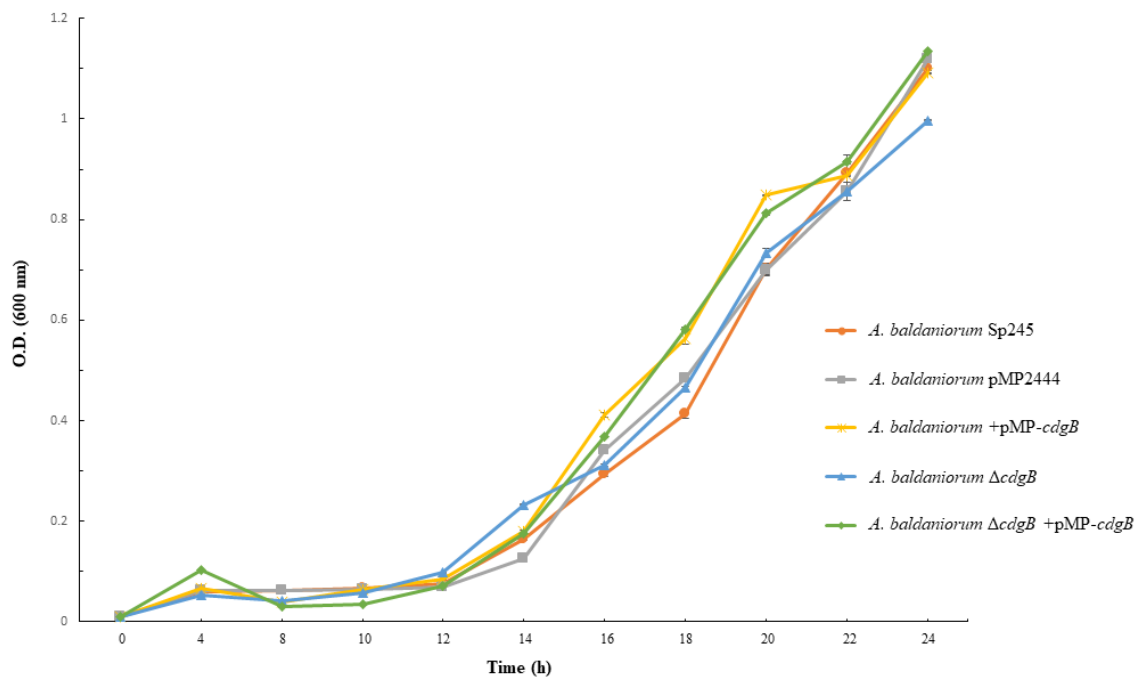
Para poder evaluar el efecto de la proteína CdgB con probable actividad dual (DGC y PDE) sobre los fenotipos de formación de biopelícula, producción de SPE y motilidad en *A. baldaniorum* Sp245, se comenzó por generar una cepa de *A. baldaniorum* con *cdgB* eliminado ( $\Delta cdgB$ ), asimismo se crearon variantes con un enfoque de sobreexpresión de *cdgB* (PMP-*cdgB*) para evaluar el efecto de la pérdida o exceso del número de copias de *cdgB*. También se generaron mutaciones puntuales en los motivos GGDEF y EAL para crear motivos degenerados donde se eliminen sus actividades, si es que la tuvieran, para corroborar su funcionalidad (PMP- $cdgB_{SGDEF-SGKEF}$  y PMP- $cdgB_{EAL-AAL}$ , respectivamente). Aunado a ello, se incluyó en el presente estudio a la cepa mutada en el dominio MHYT (PMP- $cdgB_{\Delta MHYT}$ ), generada por Acatitla en el 2019 que permitiera determinar su importancia sobre la regulación de la función y localización de CdgB. Se tomaron como control negativo a las cepas que tuvieran el plásmido vacío PMP2444, mismo que se utilizó para la construcción de las cepas como se describe en la metodología.

Se evaluó el comportamiento de cada cepa sobre los fenotipos de formación de biopelícula, producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y motilidad dado a que estos fenotipos están íntimamente conectados con la concentración del diGMPc de la bacteria.

### 7.2.2 Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento en las cepas de interés utilizando el medio NFb complementado con  $KNO_3$  (Figura 13). Los resultados mostraron que todas las cepas evaluadas presentaron crecimientos similares. Por lo tanto, el plásmido PMP2444 utilizado para la generación de las cepas no repercute sobre el crecimiento de las bacterias, aunque sea un plásmido de alto número de copias y expresión constitutiva. Del mismo modo, las

cepas mutantes  $\Delta cdgB$  y  $\Delta cdgB$ (PMP-dgcB) tampoco presentaron cambios, por lo que el menor o mayor número de copias del gen *cdgB* no afecta al crecimiento de *A. baldaniorum*.

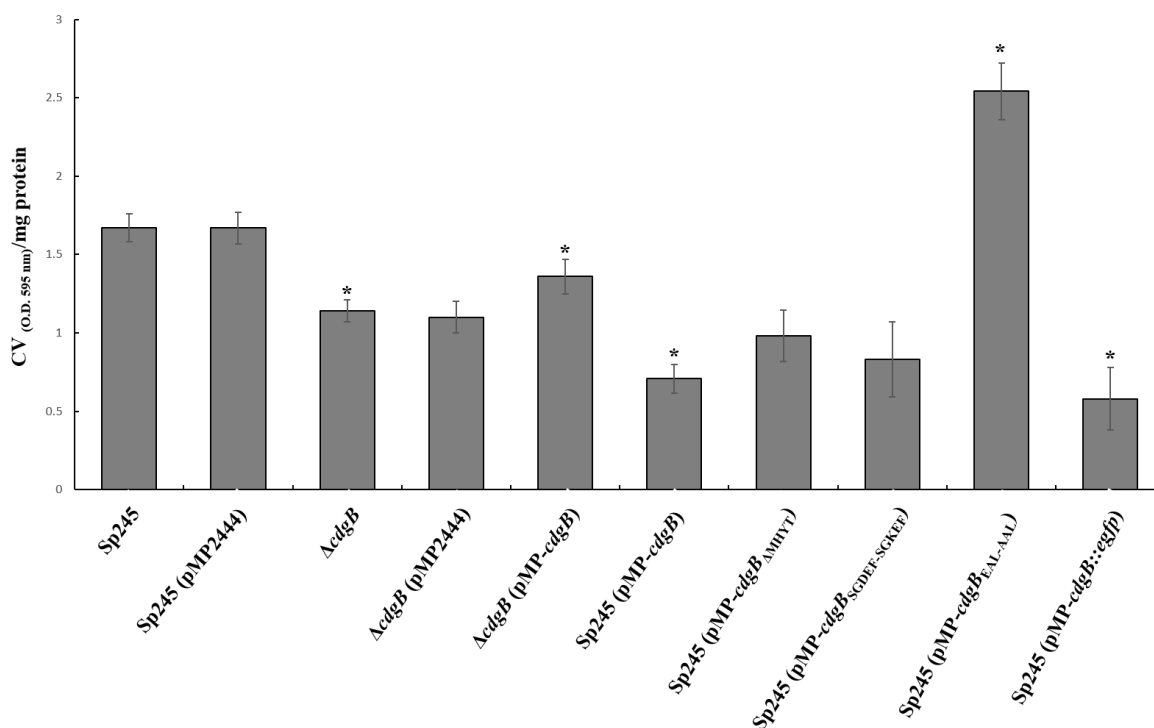


**Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas *A. baldaniorum* Sp245, Sp245 (PMP2444), Sp245 (PMP-*cdgB*),  $\Delta cdgB$  y  $\Delta cdgB$  (PMP-*cdgB*).** Las cepas fueron crecidas en medio NFB\*. Se midió la DO600nm cada 2-3 horas. Los cultivos fueron mantenidos por 24 h a 30°C en agitación constante (150 r.p.m). Los datos muestran los resultados de 3 cultivos independientes para cada cepa.

### 7.2.3 Formación de biopelícula.

En el fenotipo de formación de biopelícula crecida en medio NFb complementado con  $KNO_3$  (Figura 14) se observó que la cepa  $\Delta cdgB$  presentó una biopelícula disminuida en un 25% con respecto a la cepa Sp245. Este resultado sugiere que la ausencia del gen afecto la formación de biopelícula, posiblemente a causa de la disminución del diGMPc en la bacteria, y por lo tanto, CdgB podría actuar como una DGC bajo estas condiciones. Cuando se evalúa la cepa complementada  $\Delta cdgB$ (pMP-*cdgB*) se observa una restauración parcial del fenotipo. Por el contrario, cuando se analizan las cepas que presentan la sobreexpresión teniendo el fondo genético de la cepa silvestre: Sp245(pMP-*cdgB*), Sp245(pMP-*cdgB* $\Delta$ MHYT) y Sp245(pMP-*cdgB*SGDEF-SGKEF), se nota una disminución de biopelícula comparándolas con el resto de cepas. Este resultado indica que la sobreexpresión de *cdgB*, en presencia de la copia endógena del gen, ocasiona que CdgB actué como una PDE. Para validar que el dominio EAL de CdgB es responsable de la disminución observada en la

formación de biopelícula, se analizó el fenotipo de una cepa que sobreexpresa al gen *cdgB* con el motivo EAL inactivo a través de una mutación puntual, sustituyendo el residuo E (ácido glutámico) por A (alanina) (cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>). Esta misma cepa mostro una formación de biopelícula mayor en comparación a todas las cepas analizadas. Estos resultados sugieren que CdgB presenta una actividad dual como DGC y PDE, donde cada actividad se enciende bajo condiciones específicas que faltan por ser estudiadas.

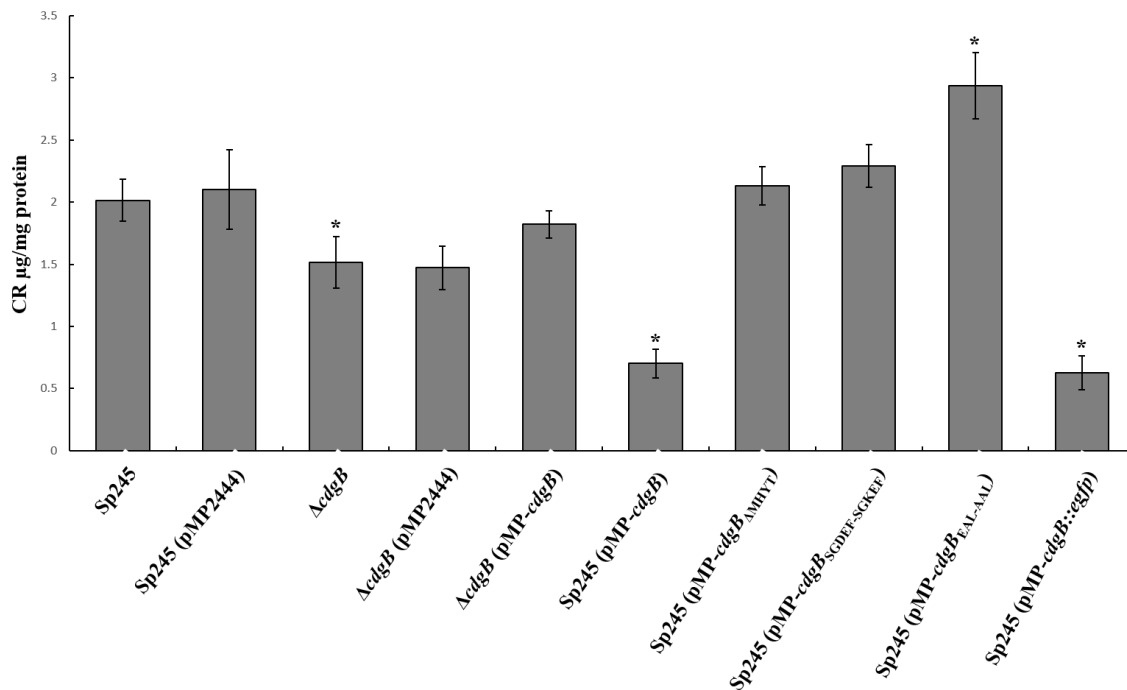


**Figura 14. CdgB afecta la formación de biopelícula de *A. baldaniorum*.** Gráfico que representa la media y la desviación estándar del análisis de biopelículas a partir de 5 días de crecimiento en condiciones estáticas a 30 °C. Los datos representan los resultados de tres experimentos independientes con tres réplicas biológicas. Una diferencia significativa en comparación a la cepa Sp245 ( $P < 0.05$ ) se representa como "\*" y una diferencia en comparación a Sp245(pMP-*cdgB*) se representa como "\*" de acuerdo con la prueba de t de Student.

#### 7.2.4 Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares

A continuación, se estimó la capacidad de las cepas para producir las SPE (Figura 15) que están estrechamente ligadas a la formación de biopelícula. El colorante Rojo Congo utilizado en este ensayo tiene afinidad al ADN extracelular, exopolisacáridos y proteínas, las cuales, conforman la matriz de la biopelícula y son sensibles a los niveles del diGMPc. Similar a lo observado en la formación de biopelícula (Figuras 10 y 11), la eliminación y sobreexpresión de *cdgB* indican una probable función dual de DGC y PDE. La

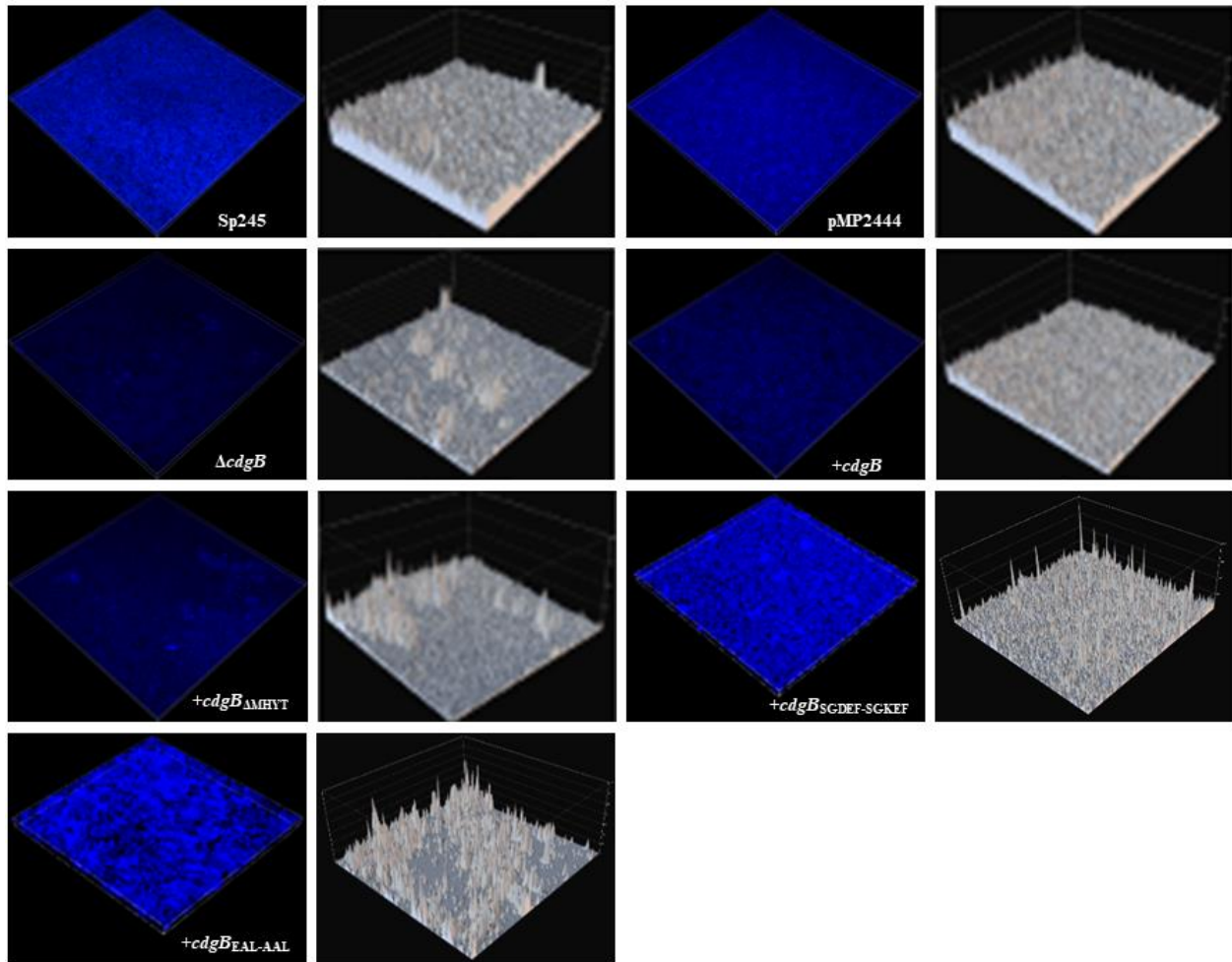
complementación reestablece parcialmente la mutación  $\Delta cdgB$  y la cepa Sp245(pMP-cdgB<sub>EAL-AAL</sub>) muestra una producción de SPE más elevadas comparándola con las otras cepas. Sin embargo, las cepas Sp245(pMP-cdgB<sub>ΔMHYT</sub>) y Sp245(pMP-cdgB<sub>SGDEF-SGKEF</sub>) no mostraron diferencia con respecto a Sp245.



**Figura 15. CdgB afecta la acumulación de SPE en *A. baldaniorum*.** Gráfico que representa la media y la desviación estándar de la cuantificación de las SPE después de 5 días de crecimiento en condiciones estáticas a 30 °C. Una diferencia significativa en comparación a la cepa Sp245 ( $P < 0.05$ ) se representa como "\*" y una diferencia en comparación a Sp245(pMP-cdgB) se representa como "\*" de acuerdo con la prueba de t de Student.

Posteriormente, para observar la contribución de cada dominio sobre la arquitectura de la matriz de la biopelícula, las cepas fueron cultivadas en NFB\* complementadas con  $KNO_3$  y se utilizó el colorante Calcofluor bajo condiciones estáticas durante 5 días de crecimiento y posteriormente visualizadas por CLSM (Figura 16). Este colorante tiene afinidad por los polisacáridos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 uniéndose a polisacáridos capsulares y exopolisacáridos producidos por *Azospirillum* (Del Gallo *et al.*, 1989). Las imágenes indicaron que la cepa  $\Delta cdgB$  tiene una menor producción de polisacáridos con respecto a Sp245, lo mismo ocurre con Sp245(pMP-cdgB), ya que presenta una reducción en la producción de polisacáridos presentes en la biopelícula madura en comparación con la cepa silvestre y pMP2444,

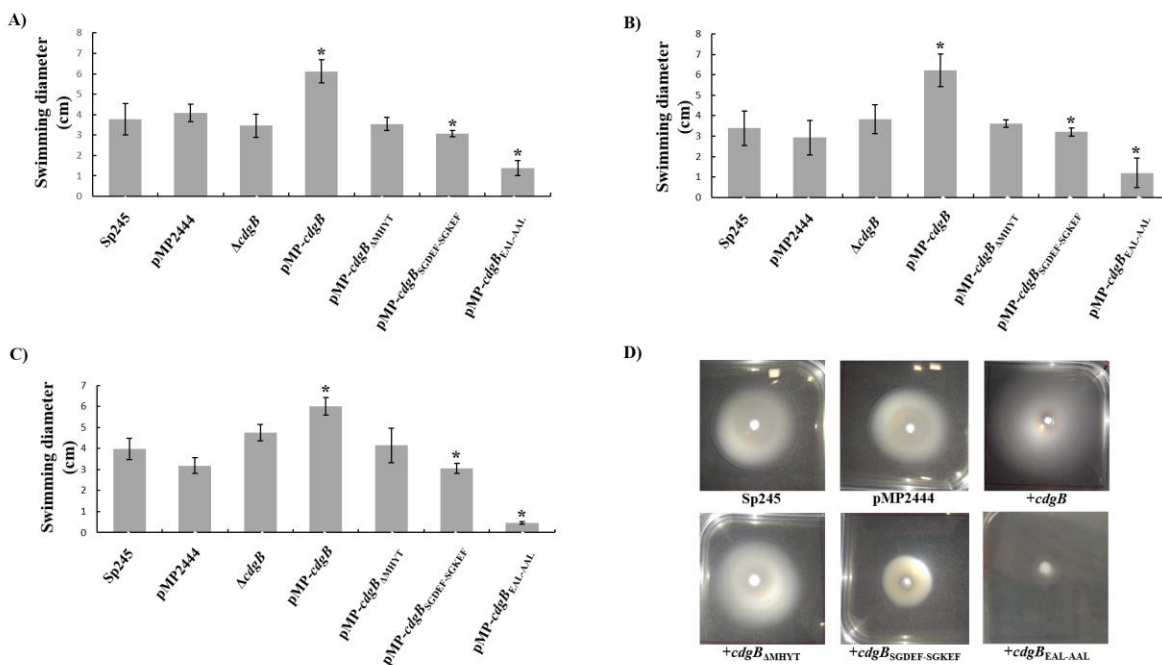
comportamiento similar a lo observado en la formación de biopelícula (Figuras 14 y 16). Por el contrario, Sp245(pMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>) produjo más polisacáridos que el resto de cepas, pudiéndose apreciar en la Figura 16. La cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>SGDEF-SGKEF</sub>) presentó una producción de polisacáridos similar a la cepa silvestre pero menor en Sp245(pMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>). En el caso de Sp245(pMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>) se presentó un comportamiento similar al de Sp245(pMP-*cdgB*). Estos datos concuerdan en que los dominios GGDEF y EAL son funcionales.



**Figura 16. Análisis de formación de biopelícula por microscopía de escáner láser confocal.** Las imágenes representan la reconstrucción tridimensional de las biopelículas estáticas y crecidas por 5 días, la fluorescencia azul representa la tinción de exopolisacáridos. Las imágenes grises son gráficos de la intensidad de superficie correspondiente a la fluorescencia emitida por el Calcofluor. La biopelícula formada se observó directamente utilizando un microscopio confocal Nikon C2+ con un objetivo 20X (CFI Plan ApVC 20X apertura numérica de 1.2).

### 7.2.5 Ensayos de movilidad

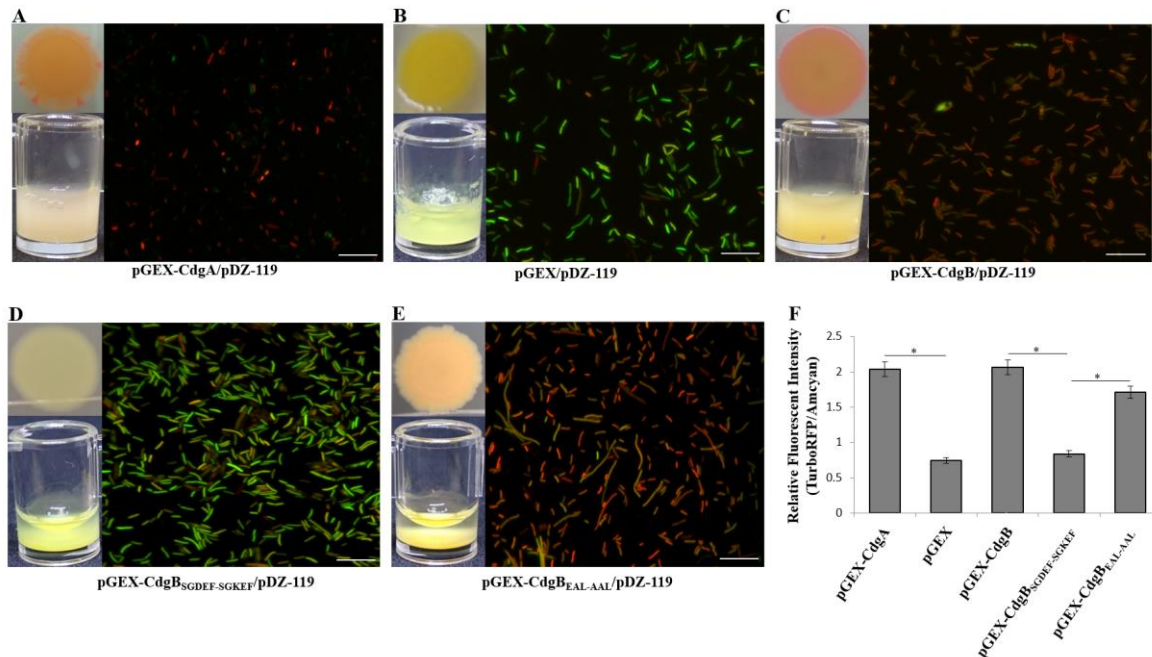
La motilidad es otro fenotipo que es regulado por el diGMPc, mientras que la formación de biopelícula, película y SPE incrementan junto con las concentraciones intracelulares del diGMPc, la movilidad tiene el efecto contrario, ya que a medida que el diGMPc intracelular incrementa, la movilidad de la bacteria disminuye promoviendo un estado de vida sésil. Es así como se evaluó el efecto de la motilidad de nado en *A.aldaniorum* Sp245 y sus distintas variantes analizadas en presencia de una distintas señales químico sensoriales, como lo son: el malato, succinato y prolina (Figura 17). La eliminación de *cdgB* no tuvo efecto aparente en la movilidad, mientras que la sobreexpresión de *cdgB* promovió la motilidad de nado en presencia de todos los quimioattractantes probados (Figura 17A, B, C) observando un halo de mayor movilidad con respecto a todas las cepas (Figura 17D), fenotipo esperando cuando se sobreexpresa una proteína con función PDE. Por otro lado, la cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>) presentó una motilidad disminuida con respecto a la sobreexpresión, demostrando la importancia del dominio EAL sobre el desempeño de la bacteria en este fenotipo. Las cepas Sp245(pMP-*cdgB*<sub>SGDEF-SGKEF</sub>) y Sp245(pMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>) mostraron una motilidad similar a la cepa silvestre. En conjunto estos datos concuerdan con lo ya visto en la formación de biopelícula y producción de SPE recalcando la importancia de los dominios DGC y PDE. Aunado a ello, estos resultados sugieren que el dominio MHYT podría estar involucrado en el control de la funcionalidad de CdgB.



**Figura 17. CdgB afecta la motilidad en *A. baldaniorum*.** Los gráficos representan la media de los halos de motilidad (cm) de las cepas indicadas en placas con medio K y agar 0,25%, complementadas con (A) malato, (B) succinato o (C) prolina (10 mM) a 30 °C durante 48 h. Las barras de error indican desviaciones estándar de 6 réplicas por cepa. (D) Imágenes representativas de los halos de motilidad de tres experimentos independientes con dos determinaciones biológicas. Las diferencias significativas con respecto a Sp245 ( $P < 0,005$ ) se representan como “\*” según la prueba t de Student.

### 7.2.6 CdgB tiene actividad DGC en *Escherichia coli*

Para analizar el efecto de CdgB sobre la acumulación del diGMPc se examinaron los niveles intracelulares del segundo mensajero a través del uso de un biosensor en el sistema heterólogo *E. coli* S17.1. Este biosensor expresa a las proteínas AmCyan y TurboRFP, ambas proteínas fluorescentes (verde y roja, respectivamente), a partir de un mismo promotor constitutivo. La producción de TurboRFP se inhibe a bajos niveles del diGMPc, mientras que cuando la concentración del segundo mensajero aumenta, la proteína TurboRFP aumenta proporcionalmente (Martínez-Méndez *et al.*, 2021 y Zhou *et al.*, 2016). Para este análisis se utilizó a la cepa pGEX-CdgB/pDZ-119 que expresa a la proteína sin modificaciones. También se utilizaron a las cepas pGEX-CdgB<sub>SGDEF-SGKEF</sub>/pDZ-119 y pGEX-CdgB<sub>EAL-AAL</sub>/pDZ-119 que representan a la proteína con las mutaciones puntuales en el dominio GGDEF y EAL, respectivamente. La evaluación de la cepa pGEX-CdgB/pDZ-119 dió lugar a la aparición de células fluorescentes rojas y a la formación de colonias rojas, indicando que el diGMPc incrementó (Figura 18C). La cepa pGEX-CdgB<sub>SGDEF-SGKEF</sub>/pDZ-119 mostró fluorescencia verde, comprobando que la interrupción en la actividad del dominio GGDEF generó que el diGMPc disminuyera por falta de una proteína con actividad DGC (Figura 18D). Por otro lado, en la cepa pGEX-CdgB<sub>EAL-AAL</sub>/pDZ-119 se observó una fluorescencia roja, sugiriendo niveles altos de diGMPc (Figura 18E). Estos resultados se comprobaron utilizando a las cepas pGEX/pDZ-119 y pGEX-CdgA/pDZ-119, donde la primera posee el plásmido vacío pGEX (control negativo), mientras que la última sobreexpresa la proteína CdgA con actividad DGC (control positivo) (Figura 18A y B, respectivamente) (Ramírez-Mata *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que CdgB posee ambas funciones DGC y PDE en *E. coli*

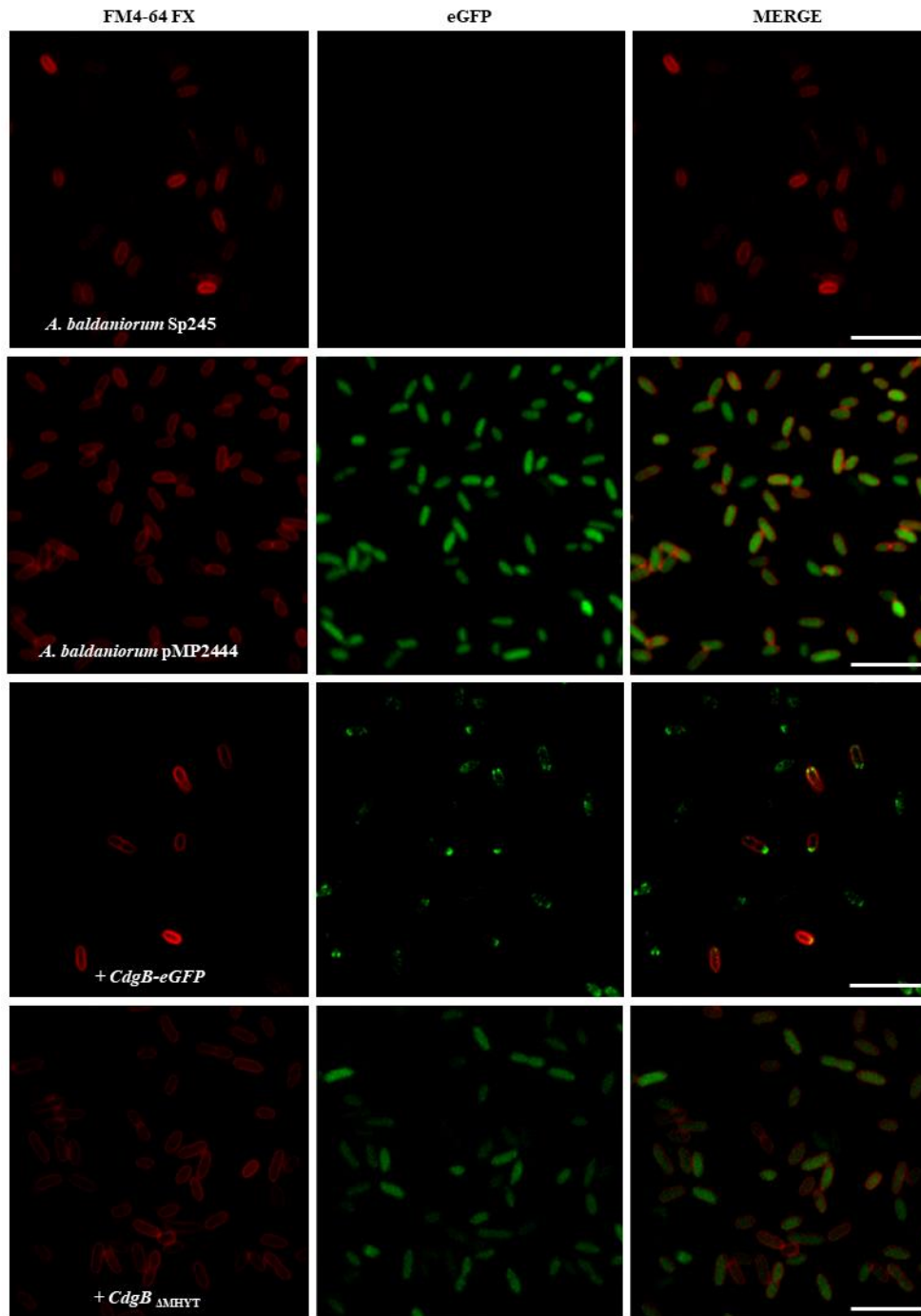


**Figura 18. CdgB regula la concentración del diGMPc en *E. coli*.** Imágenes representativas de ensayos por microscopía de los niveles del diGMPc evaluados por la fluorescencia verde y roja de las colonias y el crecimiento de cepas que albergan el biosensor genético pDZ-119, así como el plásmido. (A) pGEX-CdgA (control positivo), (B) pGEX (control negativo), (C) pGEX-CdgB, (D) el plásmido pGEX-CdgB<sub>SGDEF-SGKEF</sub> y (E) el plásmido pGEX-CdgB<sub>EAL-AAL</sub>. (F) La intensidad relativa de la fluorescencia representa la relación entre las intensidades de fluorescencia de TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de di-GMPc. La intensidad relativa de la fluorescencia se obtuvo de tres ensayos independientes y las diferencias significativas ( $P < 0,005$ ) se representan como "\*\*\*". La barra blanca corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . Las imágenes mostradas son representativas de tres ensayos independientes.

### 7.2.7 Microcompartimentación de CdgB mediado por el dominio MHYT.

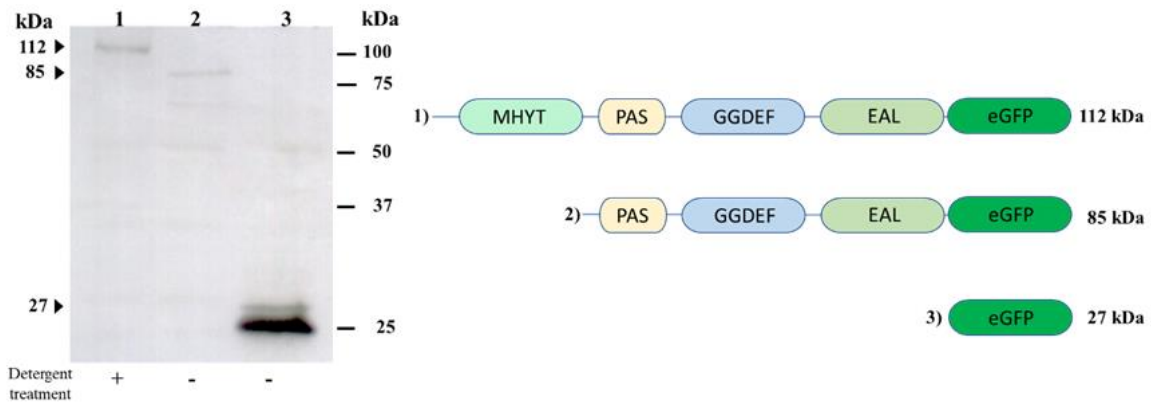
Distintos estudios han demostrado que algunas proteínas involucradas en el metabolismo del diGMPc requieren una localización concreta dentro de la bacteria para llevar a cabo su función final (Boehm *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2004). Asimismo, los análisis bioinformáticos mencionados anteriormente sugieren que CdgB posee un dominio MHYT con siete hélices transmembrana (Figura 9), razón por lo cual se evaluó si la proteína CdgB presentaba una localización definida dentro de la bacteria o si se encontraba distribuida a lo largo de toda la membrana citoplasmática. Estas observaciones impulsaron la construcción de la cepa Sp245(pMP-*cdgB*-eGFP), donde se realizó la fusión traduccional entre los genes *cdgB* y eGFP. Esta cepa fue evaluada mediante ensayos de microscopía de fluorescencia añadiendo la tinción FM4-64FX, un fluoróforo específico de lípidos de membrana que emite una fluorescencia roja, el cual nos permitió delimitar el cuerpo celular de *A. baldaniorum*.

La Figura 19 muestra que CdgB se encuentra en los polos de la bacteria observando una fluorescencia verde. Sin embargo, cuando se eliminó el dominio MHYT en la cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>), la unión de la proteína anclada a los polos se perdió y en su lugar, se detectó la fluorescencia verde con una distribución ubicua en *A. baldaniorum*, mismo patrón que se observa en la cepa pMP2444 donde se sobreexpresa únicamente el gen reportero eGFP.



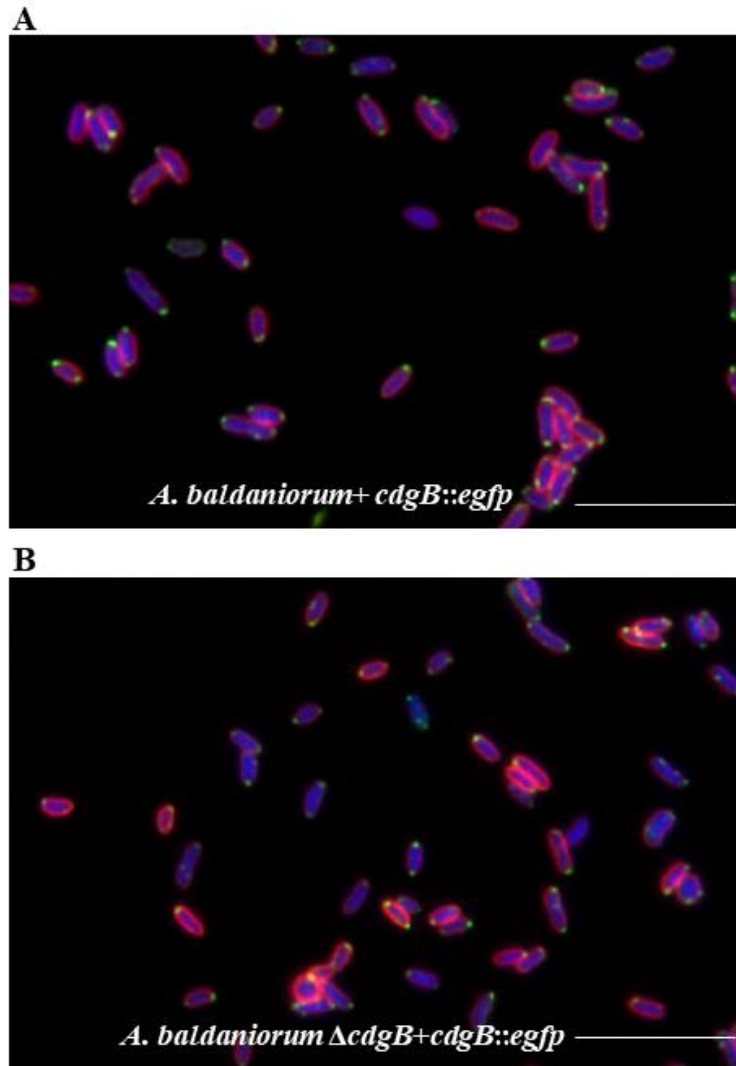
**Figura 19. CdgB se encuentra unido a la membrana citoplasmática en los polos.** Las dos primeras columnas, de izquierda a derecha, muestran imágenes representativas adquiridas donde se detectó la fluorescencia del fluoróforo FM4 64FX (rojo) que se une a las membranas lipídicas, y la fluorescencia de la proteína eGFP (verde). La tercera columna muestra un solapamiento de las imágenes con fluorescencia verde y roja. Las puntas de flecha blancas indican la localización polar de la proteína CdgB. La barra blanca corresponde a 10  $\mu$ M.

Consistente con la anterior observación, un análisis realizado por Western Blot, en donde se tomó el lisado celular completo de la cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>ΔM<sub>HYT</sub></sub>) se detectó la proteína trunca (PAS-GGDEF-EAL) con un MMr de 85 kDa, mientras que los lisados obtenidos de Sp245(pMP-*cdgB*-eGFP) mostraron un MMr de 112 kDa (Figura 20)



**Figura 20. Análisis Western blot de las proteínas CdgB::eGFP y CdgB<sub>ΔM<sub>HT</sub></sub>::eGFP.** Detección por Western blotting de las proteínas de fusión CdgB::eGFP y la variante donde se eliminó el dominio M<sub>HYT</sub>. Carril 1.- *A. baldaniorum* +*cdgB*::eGFP; carril 2.- *cdgB*<sub>ΔM<sub>HT</sub></sub>::eGFP y carril 3.- pMP2444. El peso molecular relativo (MMr) se indica como kDa. Las flechas negras indican MMr en kDa. Las figuras correspondientes representan las proteínas.

Para corroborar que la localización observada no fuera causa de un artefacto generado por la expresión de *cdgB*-eGFP en presencia del gen endógeno, se utilizó la cepa Δ*cdgB*+*cdgB*::eGFP, donde se observó la misma localización de la proteína en los polos de la bacteria (Figura 21).



**Figura 21. Localización celular de CdgB en cepas de *A. baldaniorum*.** Las cepas A) *A. baldaniorum* +*cdgB::egfp*, B) *A. baldaniorum*  $\Delta$ *cdgB*+*cdgB::egfp* fueron crecidas en medio NFb\*. Las fotografías de la fusión entre GFP en Sp245 y  $\Delta$ *cdgB* fueron detectadas utilizando un microscopio de fluorescencia (TE 2000U; Nikon). Las distintas localizaciones: polar y bipolar de la proteína CdgB-eGFP fueron observadas. En rojo se muestran los lípidos de la membrana al utilizar FM4-64X, la fusión CdgB-eGFP en verde y en azul el ADN del intracelular mediante DAPI. Las imágenes son representaciones de 3 repeticiones. La barra blanca indica 10  $\mu$ m

## 8 DISCUSION

La formación de la biopelícula es un proceso complejo y altamente regulado, resultado de una adaptación ante las condiciones del ambiente como cambios de temperatura, pH, estado redox, nutrientes y niveles de oxígeno (Qi *et al.*, 2009; Römling *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019). El diGMPc actúa como un segundo mensajero intracelular que regula procesos fisiológicos como la movilidad, formación de biopelícula, producción de polisacáridos, diferenciación celular y virulencia a través su concentración interna en la bacteria (Römling *et al.*, 2013; Jenal *et al.*, 2017).

En este estudio, se describió al gen *cdgB* que codifica para una proteína híbrida que posee dos dominios encargados en la detección de las condiciones ambientales: el dominio MHYT, anclado a la membrana citoplasmática; y el dominio PAS dispuesto en el citoplasma, ambos se encuentran en la región amino de la proteína y están unidos a los dominios GGDEF y EAL, los cuales son funcionales y están en la región carboxilo de la proteína.

A través de análisis de acoplamiento molecular se pudo predecir la actividad DGC del dominio GGDEF a través de análisis *in silico* (Figura 10). Además; el análisis de los alineamientos de secuencias mostró que la mayoría de los residuos presentes en una proteína DGC competente se encuentran en CdgB (Figura 10A) y aunque se encontró la presencia de degeneraciones parciales en el sitio activo del dominio GGDEF (GGDEF a SGDEF) e inhibidor (RXXD a PXXD), tanto en análisis fenotípicos como microscópicos utilizando el biosensor indican contundentemente que CdgB es una DGC funcional, por lo tanto, el sitio activo es funcional, mostrando la flexibilidad del dominio, sin embargo se necesitan más análisis para comprobar si el sitio inhibitorio es funcional, ya sea mediante mutaciones puntuales sustituyendo el motivo degenerado PXXD por el canónico RXXD y evaluar su comportamiento con los mismos fenotipos analizados en este trabajo. Del mismo modo, se predijo la actividad de PDE del dominio EAL (Figura 11). Todos los residuos implicados en la interacción con los iones diGMPc y  $Mg^{+2}$  se encuentran conservados junto con el bucle 6 y el residuo E<sup>670</sup> que dan flexibilidad a la proteína para adoptar la conformación necesaria para la catálisis. Esto es consistente a lo observado en los análisis fenotípicos y de microscopia, los cuales indican que este dominio EAL si es funcional y por lo tanto, la proteína CdgB posee ambas actividades: DGC y PDE.

Dentro de los análisis fenotípicos probados, se observó un constante comportamiento como PDE en la sobreexpresión de CdgB, cepa Sp245(pMP-*cdgB*), con una drástica disminución en la formación de biopelícula (Figura 14 y 16) y producción de SPE (Figura 15), mientras

que la movilidad (Figura 17) se vio aumentada con respecto al resto de células, comportamiento esperado cuando se sobreexpresa una proteína PDE (Gjermansen *et al.*, 2006). Sin embargo, esto se contrapone cuando se evaluó a Sp245(pMP-*cdgB*) dentro de un sistema heterólogo como *E.coli* y utilizando el biosensor pDZ-119 (Figura 18), dado a que la sobreexpresión de CdgB género que las células mostraran fluorescencia roja, indicativo que la concentración intracelular del diGMPc aumento y por consiguiente había actividad DGC. Este resultado se puede explicar tomando en cuenta que el ensayo se realizó en un sistema heterólogo o también podría ser causa de las condiciones utilizadas para el experimento.

A continuación, cuando se mutó el dominio EAL, cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>EAL-AAL</sub>), reemplazando el ácido glutámico 580 por una alanina, residuo implicado en la coordinación del ion Mg<sup>+2</sup> y que se ha reportado que afecta significativamente la actividad de la PDE (Rao *et al.*, 2008); dio como resultado que la cepa actuara ahora como DGC en todos los fenotipos evaluados; con una mayor formación de biopelícula (Figura 14), un incremento en la producción de SPE (Figura 15), una movilidad disminuida (Figura 17) y con células con fluorescencia roja (Figura 18) constatando que el dominio EAL es funcional.

Por el contrario, si bien la mutación del dominio GGDEF, cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>SGDEF-SGKEF</sub>), presento un comportamiento de PDE, su desempeño no fue similar a lo observado en Sp245(pMP-*cdgB*). Se remarca esto, ya que se esperaba que al eliminar la funcionalidad del dominio involucrado en la producción del segundo mensajero (dominio GGDEF), esto le permitiría al dominio EAL actuar libremente, potenciando aún más la actividad PDE, disminuyendo la concentración de diGMPc, y por consiguiente ver un desempeño en los fenotipos similar a la cepa Sp245(pMP-*cdgB*). Una posible respuesta para este resultado es que posiblemente el dominio GGDEF es necesario para el correcto funcionamiento del dominio EAL, influyendo en este para que alcance su máxima capacidad catalítica como PDE. Un ejemplo de tal situación se encuentra en la proteína RbdA. En ese trabajo, Liu y colaboradores en el 2018 comprueban que los dominios GGDEF y EAL de RbdA son funcionales, pero observan que el dominio EAL se ve alostéricamente inducido por la presencia de GTP, sustrato del dominio GGDEF. Este sustrato se une a través de un ion Mg<sup>+2</sup> al sitio activo GGDEF, siendo el ácido aspártico (D) el responsable de dicha interacción. Por lo que una mutación sobre este aminoácido afecta la interacción con el sustrato GTP dando como resultado una actividad PDE menos eficiente. Esto explicaría la diferencia en fenotipos entre las cepas Sp245(pMP-*cdgB*<sub>SGDEF-SGKEF</sub>) y Sp245(pMP-*cdgB*).

puesto que se mutó el ácido aspártico (D), mismo que está implicado en la coordinación del ion  $Mg^{+2}$  y, por ende, la unión del GTP, provocando que CdgB, si bien pueda actuar como PDE, no presente su mayor potencial catalítico.

Posteriormente, cuando se eliminó el dominio MHYT, cepa Sp245(pMP-*cdgB*<sub>ΔMHYT</sub>), se observó una diferencia con respecto a la cepa Sp245(pMP-*cdgB*) en los ensayos de formación de biopelícula (Figura 14) y movilidad (Figura 17), por lo que se propone que este dominio podría estar involucrado en la transición entre las funciones DGC y PDE. Distintas investigaciones (Hay *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). han estudiado la importancia de este dominio transmembrana en proteínas con actividad DGC y/o PDE, ejemplo de ello son las proteínas híbridas MucR y NbdA (MHYT-GGDEF-EAL) de *Pseudomonas aeruginosa*. Ellos Informan que ambas proteínas están involucradas en el desarrollo de la biopelícula a través de la percepción de óxido nítrico (ON) por el dominio MHYT. El ON es producido por la bacteria por desnitrificación cuando se encuentra en un medio con nitrato. Para NbdA reportan que el ON influye en su expresión generando una acumulación de esta proteína con actividad de PDE (Li *et al.*, 2013). En el caso de MucR observan que tiene actividades tanto de PDE como de DGC, y que estas se encuentran reguladas a través del dominio MHYT en función a la percepción de ON, de esta forma, la proteína influye sobre una posa del diGMPc para controlar la producción de alginatos y la formación de biopelícula. También muestran que el segundo motivo para el dominio MHYT es el más importante para la percepción del ON, específicamente el residuo de histidina (Hay *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). Aunado a ello, en proyectos anteriores realizados en el laboratorio Interacción bacteria-planta (Arruebarrena *et al.*, 2013), han demostrado que *A. baldaniorum* Sp245 produce ON y promueve la formación de biopelícula. Mientras que en bacterias como *P. aeruginosa* el ON promueve la dispersión de ésta. El ON se forma por la desnitrificación de nitrato a través de la enzima periplásmica nitrato reductasa (Nap) y las enzimas nitrito reductasa (NirK1 y NirK2). Con estos antecedentes, se propone que el óxido nítrico podría ser percibido por el dominio MHYT de CdgB, ya que a través de alineamientos se observó que el residuo de histidina se encuentra conservado en los tres motivos de CdgB (Figura 9). De esta manera la recepción de esta señal podría influir en la actividad de CdgB modulando los dominios GGDEF y EAL. Sin embargo, esto debe confirmarse en futuros experimentos. Es necesario mencionar que *A. baldaniorum* no produce alginatos, por lo que aún no se conoce con qué proteínas podría estar interactuando CdgB y qué vía utiliza para influir en la formación de biopelícula y movilidad.

Análisis bioinformáticos sobre genes que codifican proteínas presuntamente híbridas en genomas de *A. baldaniorum*, mostraron que solo uno codifica una proteína putativa con un receptor de dominio de siete regiones transmembranales (7TMR) (Schäper *et al.*, 2018). Estudios han indicado que los dominios de siete transmembranas están integrados a las enzimas generadoras de segundo mensajero y funcionan como receptores (Schäper *et al.*, 2018). Aparentemente, poseen un gran grado de flexibilidad que les permite detectar una amplia diversidad de estímulos, incluyendo entre ellos: nutrientes, luz, carbohidratos, oxígeno, NO y CO (Galperin *et al.*, 2001; Hay *et al.*, 2009). Por lo tanto, se hace hincapié que el dominio transmembrana MHYT confiere dos funciones significativas a la proteína CdgB, una al localizar la proteína en los polos de la membrana citoplasmática, y la otra al afectar la funcionalidad PDE y/o DGC de la proteína. Esto es novedoso, ya que hasta la fecha no se ha reportado ninguna localización específica de proteínas que posean el dominio MHYT. Con esta evidencia se propone que CdgB podría modular una poza intracelular del diGMPc localizada en los polos, misma que sería reconocida por reguladores de respuesta para afectar el desarrollo de movilidad y formación de biopelícula. Entre los reguladores de respuesta que pudieran detectar los niveles del diGMPc regulados por CdgB, se encuentran Tlp1 y Aer, ambos receptores de quimiotaxis involucrados en la detección de oxígeno que incorporan el reconocimiento del diGMPc a través del dominio PilZ, dominio conservado en estas proteínas (Russell *et al.*, 2013 y O'Neal *et al.*, 2019). Estos receptores quimio sensoriales podrían participar junto con CdgB para modular una posa del diGMPc, y de esta forma afectan el fenotipo de movilidad en función a las condiciones ambientales de ON y oxígeno.

## 9 CONCLUSION

A través de los análisis bioinformáticos y fenotípicos se comprobó que CdgB es una proteína híbrida con actividad dual DGC y PDE. Se encuentra localizada en los polos de *A. baldaniorum* Sp245 mediante el dominio MHYT y donde pudiera estar influyendo sobre una posa local del diGMPc reconociendo los estímulos ambientales de ON y oxígeno.

## 10 REFERENCIAS

1. Alexandre G. 2010. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviors by energy taxis receptors. *Microbiology* 156:2283–2293.
2. Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Environ Microbiol*. 2013
3. Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ Microbiol Rep*. 2014;6:534–44.
4. Arruebarrena Di Palma A, M. Pereyra C, Moreno Ramirez L, Xiqui Vázquez ML, Baca BE, Pereyra MA, Lamattina L, Creus CM. 2013. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 338:77–85.
5. Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 4(1), 37-40.
6. Barahona E, Navazo A, Yousef C. F, Aguirre C. A, Martinez G. F, 2010 Efficientrhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens*f113 mutants unable to form biofilms onabiotic surfaces. *E. Microbiol* 12: 3185–3195.
7. Bellini D, Horrell S, Hutchin A, Phippen CW, Strange RW, Cai Y, Wagner A, Webb JS, Tews I, Walsh MA. 2017. Dimerisation induced formation of the active site and the identification of three metal sites in EAL-phosphodiesterases. *Sci Rep* 7:42166–42166.
8. Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *J. Microbiol* 28: 1327-1350
9. Bloemberg GV, Wijfjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ. 2000. Simultaneous Imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins in the Rhizosphere: New Perspectives for Studying Microbial Communities. *MPMI* 13:1170–1176.
10. Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11621–6.
11. Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R., & Baldani, V. L. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33: 1-1.

12. Chen Z, Schaap P. 2012. The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* 488:680–683.
13. Christen, M., Kulasekara, H. D., Christen, B., Kulasekara, B. R., Hoffman, L. R., & Miller, S. I. (2010). Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5983), 1295–1297
14. Cook, R. J. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual review of phytopathology*, 38: 95-116.
15. Cruz-Pérez JF, Lara-Oueilhe R, Marcos-Jiménez C, Cuatlayotl-Olarte R, Xiqui Vázquez ML, Reyes-Carmona SR, Baca BE, Ramírez-Mata A. 2021. Expression and function of the *cdgD* gene, encoding a CHASE–PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. *Sci Rep* 11:520.
16. Dahlstrom KM, O'Toole GA. 2017. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annu Rev Microbiol* 71:179–195
17. De Zelicourt A., Al-Yousif M., Hirt H. 2013. Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance. *Mol. Plant. P.* 6:242-45.
18. Del Gallo M, Negi M, Neyra CA. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J Bacteriol* 582 171:3504–3510.
19. Finn RD, Mistry J, Schuster-Böckler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer ELL, Bateman A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34:D247-251.
20. Gille C, Föhling M, Weyand B, Wieland T, Gille A. 2014. Alignment-Annotator web server: rendering and annotating sequence alignments. *Nucleic Acids Research* 42:W3–W6.
21. Gray E, Smith D. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37:395–412.
22. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. 2012. *Molecular cloning: a laboratory manual* 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
23. Grinberg, M., Orevi, T., & Kashtan, N. 2019. Bacterial surface colonization, preferential attachment and fitness under periodic stress. *PLoS computational biology*, 15(3), e1006815.

24. Guerrero-Molina, M. F., Winik, B. C., & Pedraza, R. O. 2012. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. *Applied soil ecology*, 61: 205-212
25. Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR. 2012. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4:17.
26. Hay, I. D., Remminghorst, U., & Rehm, B. H. (2009). MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*
27. Hiltner L (1904) About new experiences and problems in the field of Bodenbakteriologie. *Works Ger Agric Soc* 98: 59–78.
28. Jijón-Moreno S, Baca BE, Castro-Fernández DC, Ramírez-Mata A. 2019. TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7. *PLoS ONE* 14:e0211904.
29. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE. 2021. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research* 49:D1388–D1395.
30. Kunz, S., & Graumann, P. L. (2020). Spatial organization enhances versatility and specificity in cyclic di-GMP signaling. *Biological Chemistry*, 401(12), 1323-1334.
31. Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P. 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* 34:D257- 260.
32. Li Y, Heine S, Entian M, Sauer K, Frankenberg-Dinkel N (2013) NO induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J Bacteriol* 195: 3531–3542
33. Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology spectrum*, 3(3), 3-3.
34. Liu C, Liew CW, Wong YH, Tan ST, Poh WH, Manimekalai MSS, Rajan S, Xin L, Liang Z-X, Grüber G, Rice SA, Lescar J. 2018. Insights into Biofilm Dispersal Regulation from the Crystal Structure of the PAS-GGDEF-EAL Region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 200.
35. Martínez-Méndez R, Camacho-Hernández DA, Sulvarán-Guel E, Zamorano Sánchez D. 2021. A Trigger Phosphodiesterase Modulates the Global c-di-GMP Pool, Motility, and Biofilm Formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 203.

36. 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.
37. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791.
38. Nait Chabane Y, Marti S, Rihouey C, Alexandre S, Hardouin J, Lesouhaitier O, et al. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS One*. 2014;9:e111660.
39. Oliveros-Bastidas, Alberto de J., Macías, Francisco A., Fernández, Ceferino Carrera, Marín, David, & Molinillo, José M. G.. (2009). Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*, 32(1), 198-213. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100035>
40. Omasits U, Ahrens CH, Müller S, Wollscheid B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30:884–886.
41. O'Neal L, Akhter S, Alexandre G. 2019. A PilZ-Containing Chemotaxis Receptor Mediates Oxygen and Wheat Root Sensing in *Azospirillum brasilense*. *Front Microbiol* 10:312.
42. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49–79.
43. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera A visualization system for exploratory research
44. Pérez-Mendoza D, Coulthurst SJ, Humphris S, Campbell E, Welch M, Toth IK, Salmond GPC. 2011. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase: Complex regulation of a *Pectobacterium* type I-secreted adhesin. *Molecular Microbiology* 82:719–733.
45. Petchiappan, A., Naik, S. Y., & Chatterji, D. (2020). Tracking the homeostasis of second messenger cyclic-di-GMP in bacteria. *Biophysical reviews*, 12(3), 719–730.
46. Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

47. Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2001) The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker, New York, pp 1–17
48. Prashar, Pratibha & Kapoor, Neera & Sachdeva, Sarita. (2013). Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 13. 10.1007/s11157-013-9317-z.
49. Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L., & Baca, B. E. 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista argentina de microbiología*, 46(3), 242-255.
50. Ramírez-Mata A, López-Lara LI, Xiqui-Vázquez ML, Jijón-Moreno S, Romero Osorio A, Baca BE. 2016. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Res Microbiol* 167:190–201.
51. Ramírez-Mata A, Pacheco, MR., Cruz Pérez, J. F., Sáenz, M. M., & Baca, B. E. 2018a. In silico comparative analysis of GGDEF and EAL domain signaling proteins from the *Azospirillum* genomes. *BMC microbiology*, 18(1), 1-14.
52. Ramirez-Mata A, Pacheco MR, Moreno SJ, Xiqui-Vazquez ML, Baca BE. 2018b. Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with egfp and mCherry genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots. *Microbiol Res* 215:155–163.
53. Rivera Botia, D. M. 2008. Tesis de Licenciatura Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. Universidad Francisco de Paula Santander. San Jose de Cocuta.
54. Russell MH, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M, Alexandre G. 2013. Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* 4:e00001-00013.
55. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
56. Sierra Cacho D, Zamorano Sánchez DS, Xiqui-Vázquez ML, Viruega Góngora VI, Ramírez-Mata A, Baca BE. 2021. CdgC, a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase of

- Azospirillum baldaniorum Is Involved in Internalization to Wheat Roots. *Front Plant Sci* 12:748393.
57. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1:784–791.
  58. Steenhoudt O, Vanderleyden J. (2000). Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487-506.
  59. Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(12), 1024–1037. <https://doi.org/10.1038/nrm1524>
  60. Wang, Y., Hay, I. D., Rehman, Z. U., & Rehm, B. H. (2015). Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(17), 7253–7265.
  61. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* 46:W296–W303.
  62. Wassmann P, Chan C, Paul R, Beck A, Heerklotz H, Jenal U, Schirmer T. 2007. Structure of BeF<sub>3</sub>-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* 15:915–927.
  63. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, Verma V, Keedy DA, Hintze BJ, Chen VB, Jain S, Lewis SM, Arendall WB, Snoeyink J, Adams PD, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. 2018. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation: PROTEIN SCIENCE.ORG. *Protein Science* 27:293–315.
  64. Yang L, Ukil L, Osmani A, Nahm F, Davies J, De Souza CPC, Dou X, Perez Balaguer A, Osmani SA. 2004. Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 3:1359–1362.
  65. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite: Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite:

66. Zhou H, Zheng C, Su J, Chen B, Fu Y, Xie Y, Tang Q, Chou S-H, He J. 2016. Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Sci Rep* 6:20871.

RESEARCH ARTICLE

## The GGDEF-EAL protein CdgB from *Azospirillum baldaniorum* Sp245, is a dual function enzyme with potential polar localization

Víctor I. Viruega-Góngora<sup>1</sup>, Iris S. Acatitla-Jácome<sup>1</sup>, David Zamorano-Sánchez<sup>2</sup>, Sandra R. Reyes-Carmona<sup>1</sup>, María L. Xiqui-Vázquez<sup>1</sup>, Beatriz Eugenia Baca<sup>1</sup>, Alberto Ramírez-Mata<sup>1\*</sup>

**1** Laboratorio de la Interacción bacteria-plantas, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla Pue, México, **2** Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

\* [alberto.ramirez@correo.buap.mx](mailto:alberto.ramirez@correo.buap.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Viruega-Góngora VI, Acatitla-Jácome IS, Zamorano-Sánchez D, Reyes-Carmona SR, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE, et al. (2022) The GGDEF-EAL protein CdgB from *Azospirillum baldaniorum* Sp245, is a dual function enzyme with potential polar localization. PLOS ONE 17(11): e0278036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278036>

**Editor:** Ching-Hong Yang, University of Wisconsin Milwaukee, UNITED STATES

**Received:** August 2, 2022

**Accepted:** November 8, 2022

**Published:** November 23, 2022

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278036>

**Copyright:** © 2022 Viruega-Góngora et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and

### Abstract

*Azospirillum baldaniorum* Sp245, a plant growth-promoting rhizobacterium, can form biofilms through a process controlled by the second messenger cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP). *A. baldaniorum* has a variety of proteins potentially involved in controlling the turnover of c-di-GMP many of which are coupled to sensory domains that could be involved in establishing a mutualistic relationship with the host. Here, we present *in silico* analysis and experimental characterization of the function of CdgB (AZOBR\_p410089), a predicted MHYT-PAS-GGDEF-EAL multidomain protein from *A. baldaniorum* Sp245. When overproduced, CdgB behaves predominantly as a c-di-GMP phosphodiesterase (PDE) in *A. baldaniorum* Sp245. It inhibits biofilm formation and extracellular polymeric substances production and promotes swimming motility. However, a CdgB variant with a degenerate PDE domain behaves as diguanylate cyclase (DGC). This strongly suggest that CdgB is capable of dual activity. Variants with alterations in the DGC domain and the MHYT domain negatively affects extracellular polymeric substances production and induction of swimming motility. Surprisingly, we observed that overproduction of CdgB results in increased c-di-GMP accumulation in the heterologous host *Escherichia coli*, suggesting under certain conditions, the WT CdgB variant can behave predominantly as a DGC. Furthermore, we also demonstrated that CdgB is anchored to the cell membrane and localizes potentially to the cell poles. This localization is dependent on the presence of the MHYT domain. In summary, our results suggest that CdgB can provide versatility to signaling modules that control motile and sessile lifestyles in response to key environmental signals in *A. baldaniorum*.

RESEARCH LETTER – Physiology &amp; Biochemistry

## Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*

V́ctor I. Viruega-Ǵngora, Iris S. Acatitla-Jácome, Sandra R. Reyes-Carmona, Beatriz E. Baca and Alberto Ramírez-Mata<sup>\*,†</sup>

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ciudad Universitaria Edif. IC11, Av. San Claudio S/N. Puebla Pue. México

<sup>\*</sup>Corresponding author: Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Ciudad Universitaria Edif. IC11, Av. San Claudio S/N. Puebla Pue. México. Tel: +01 55 222 2295500; E-mail: [alberto.ramirez@correo.buap.mx](mailto:alberto.ramirez@correo.buap.mx)**One sentence summary:** Kinetics of *Azospirillum brasilense* Sp7 biofilm formation on an abiotic surface, showing cells (DAPI - blue) and flagella (FITC-labeled antibody - green) in the fluorescence microscope.

Editor: Jan-Ulrich Krefit

<sup>†</sup>Alberto Ramírez-Mata, <http://orcid.org/0000-0002-2119-2254>

### ABSTRACT

Elucidation of biofilm structure formation in the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* is necessary to gain a better understanding of the growth of cells within the extracellular matrix and its role in the colonization of plants of agronomic importance. We used immunofluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy to study spatio-temporal biofilm formation on an abiotic surface. Observations facilitated by fluorescence microscopy revealed the presence of polar flagellin, exopolysaccharides, outer major membrane protein (OmaA) and extracellular DNA in the *Azospirillum* biofilm matrix. In static culture conditions, the polar flagellum disaggregated after 3 days of biofilm growth, but exopolysaccharides were increasing. These findings suggest that the first step in biofilm formation may be attachment, in which the bacterium first makes contact with a surface through its polar flagellum. After attaching to the surface, the long flagella and OmaA intertwine the cells to form a network. These bacterial aggregates initiate biofilm development. The underlying mechanisms dictating how the biofilm matrix components of *A. brasilense* direct the overall morphology of the biofilm are not well known. The methods developed here might be useful in further studies that analyze the differential spatial regulation of genes encoding matrix components that drive biofilm construction.

**Keywords:** extracellular matrix; polar flagellum; exopolysaccharides; eDNA; OmaA; biofilm formation; *Azospirillum*

### INTRODUCTION

The genus *Azospirillum* is capable of nitrogen fixation in the free-living state and lives in association with several plants. *Azospirillum* is widely used as a soil inoculant and can promote the growth and yield of numerous agronomical and ecologically important plant species (Bashan, Holguin and De-Bashan 2004). This well-studied plant growth-promoting bacterium can produce indole-3-acetic acid, cytokinins and gibberellins and can increase plant mineral uptake (Spaepen, Vanderleyden and

Remans 2007); nevertheless, *Azospirillum* must colonize plant roots to exert their beneficial effects.

*Azospirillum brasilense* is a highly motile bacterium with mixed flagellation, comprising a single polar flagellum and several smaller lateral flagella, which direct its motility by sensing the most favorable environmental habitats (Alexandre 2015). The attachment of the bacteria to the root surface precedes colonization and is supposedly a two-step process. In the first step, which is dependent on the presence of the polar flagellum, motile *Azospirillum* cells loosely attach to the root surface

Received: 6 July 2019; Accepted: 25 February 2020

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press on behalf of FEMS. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



# CdgC, a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase of *Azospirillum baldaniorum* Is Involved in Internalization to Wheat Roots

Daniel Sierra Cacho<sup>1</sup>, David S. Zamorano Sánchez<sup>2</sup>, María Luisa Xiqui-Vázquez<sup>1</sup>, Víctor Iván Viruega Góngora<sup>1</sup>, Alberto Ramírez-Mata<sup>1</sup> and Beatriz E. Baca<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Katharina Pawłowski,  
Stockholm University, Sweden

### Reviewed by:

Juan Sanjuan,  
Estación Experimental de Zaidín,  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC), Spain  
Max Dow,  
University College Cork, Ireland  
Roshni R. Kharadi,  
Michigan State University,  
United States

### \*Correspondence:

Beatriz E. Baca  
beatriz.baca@correo.buap.mx;  
beatrizbaca@gmail.com

### Specialty section:

This article was submitted to  
Plant Symbiotic Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

Received: 27 July 2021

Accepted: 20 September 2021

Published: 20 October 2021

### Citation:

Sierra Cacho D,  
Zamorano Sánchez DS,  
Xiqui-Vázquez ML,  
Viruega Góngora VI, Ramírez-Mata A  
and Baca BE (2021) CdgC,  
a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase  
of *Azospirillum baldaniorum* Is  
Involved in Internalization to Wheat  
Roots. *Front. Plant Sci.* 12:748393.  
doi: 10.3389/fpls.2021.748393

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, Puebla, Mexico, <sup>2</sup> Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

*Azospirillum baldaniorum* is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) capable of fixing nitrogen, the synthesis of several phytohormones including indole-acetic acid, and induction of plant defenses against phytopathogens. To establish a successful and prolonged bacteria-plant interaction, *A. baldaniorum* can form biofilms, bacterial communities embedded in a self-made matrix formed by extracellular polymeric substances which provide favorable conditions for survival. A key modulator of biofilm formation is the second messenger bis-(3'-5')-cyclic-dimeric-GMP (c-di-GMP), which is synthesized by diguanylate cyclases (DGC) and degraded by specific phosphodiesterases. In this study, we analyzed the contribution of a previously uncharacterized diguanylate cyclase designated CdgC, to biofilm formation and bacterial-plant interaction dynamics. We showed that CdgC is capable of altering c-di-GMP levels in a heterologous host, strongly supporting its function as a DGC. The deletion of *cdgC* resulted in alterations in the three-dimensional structure of biofilms in a nitrogen-source dependent manner. CdgC was required for optimal colonization of wheat roots. Since we also observed that CdgC played an important role in exopolysaccharide production, we propose that this signaling protein activates a physiological response that results in the strong attachment of bacteria to the roots, ultimately contributing to an optimal bacterium-plant interaction. Our results demonstrate that the ubiquitous second messenger c-di-GMP is a key factor in promoting plant colonization by the PGPR *A. baldaniorum* by allowing proficient internalization in wheat roots. Understanding the molecular basis of PGPR-plant interactions will enable the design of better biotechnological strategies of agro-industrial interest.

**Keywords:** diguanylate cyclase, extracellular polysaccharides, wheat endophyte colonization, *Azospirillum baldaniorum*, cyclic di-GMP