



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**



Instituto de Ciencias  
Centro de Investigaciones en Ciencias microbiológicas  
Posgrado en Microbiología

Estudio de LadS2 en *Azotobacter vinelandii*

## **Tesis**

Que para obtener el grado de: Maestra en Ciencias (Microbiología)  
con opción en Bioquímica y genética microbiana

Presenta: Biol. Guadalupe Itzel Rodriguez Guerra

Asesor de tesis: Dr. Miguel Castañeda Lucio

Puebla, Pue.

Noviembre 2021

# Agradecimientos

A mi familia, gracias por todo.

Al D.C. Miguel Castañeda por las enseñanzas y tutoría durante el posgrado

A Liliana por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A todos los compañeros del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, fue poco tiempo el que estuvimos juntos, pero fueron excelentes compañeros.

Al CONACyT, VIEP, ICUAP y al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, por el apoyo y becas otorgadas.

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

# Índice

Resumen.....	4
Introducción .....	6
Sistemas de dos componentes.....	8
Sistema de dos componentes: GacS/GacA.....	11
LadS y RetS: Cinasas accesorias en el SDC GacS/GacA .....	13
Estructura de las HKs GacS LadS RetS: Dominios 7TMR .....	16
<i>Azotobacter vinelandii</i> .....	18
<i>Azotobacter vinelandii</i> : ¿Una <i>Pseudomonas</i> disfrazada? .....	20
Antecedentes .....	22
Justificación .....	26
Objetivos .....	27
Resultados .....	28
Análisis de resultados y conclusiones.....	42
Referencias.....	44

# Resumen

La familia *Pseudomonadaceae*, es una familia grande e importante de las bacterias gram negativas. Los miembros de este grupo están ampliamente distribuidos como bacterias saprofitas de vida libre, pudiéndose encontrar en suelo, humedales, ambientes marinos, asociadas a plantas, e incluso en ambientes hospitalarios e industriales. La diversidad de este grupo es tal, que van desde bacterias de importancia médica como *Pseudomonas aeruginosa*, hasta bacterias de importancia biotecnológica como *Azotobacter vinelandii*.

El encontrar tal diversidad de nichos ecológicos en una misma familia bacteriana, indica que este grupo taxonómico debe tener mecanismos refinados para enfrentar cambios ambientales y así asegurar su existencia inclusive en ambientes hostiles. Para hacer frente a estos cambios y desarrollar estrategias que permitan su supervivencia, las bacterias han logrado tener una variedad de sistemas de detección del medio ambiente como lo son los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCS). Los TCS juegan un papel esencial para la adaptación y supervivencia de estos organismos, modulan funciones celulares en respuesta a cambios ambientales.

Recientemente se han descrito sistemas donde distintas cinasas pueden modular el estado de fosforilación de un mismo receptor de respuesta (RR). A estos sistemas se les ha llamado sistemas multicomponentes o redes multicinasa. Su estudio se ha convertido en un área novedosa que rompe con viejos paradigmas de los sistemas de transducción de señales.

El sistema de dos componentes GacA/GacS encuentra conservado entre distintos géneros bacterianos y es considerado como un sistema regulador global de metabolismo secundario. La regulación ejercida por este SDC comúnmente tiene como intermediario al sistema de control post- transcripcional Rsm. Los sistemas Rsm están constituidos por una proteína y dos o más pequeños RNAs reguladores (sRNAs). La proteína del sistema (RsmA), codificada por el gen *rsmA* se une a sus RNA blancos de regulación, bloqueando así su traducción y promoviendo su degradación.

En *P. aeruginosa* se ha descrito el sistema multicomponente LadS/RetS/GacS/GacA, donde las cinasas RetS y LadS son capaces de alterar la expresión de los sRNAs reguladores del sistema Rsm a través de cambios en el estado de fosforilación de la proteína GacS. Es interesante notar que aunque el sistema GacS/A se encuentra conservado entre las gamma proteobacterias, las cinasas LadS y RetS solo se han encontrado en especies *Pseudomonas* y de *Azotobacter*.

*A. vinelandii* es una gammaproteobacteria que pertenece al grupo de las *Pseudomonadaceae*. Diversos autores han catalogado a *A. vinelandii* como parte de la familia de las *Pseudomonas* debido a su similitud con *P. aeruginosa*. Entre las características en común que tienen ambos organismos, se tiene la presencia de las cinasas RetS y LadS, además de que la regulación de estas cinasas en ambos grupos bacterianos es similar.

En este trabajo se realizó una búsqueda de la distribución de las cinasas LadS1 y LadS2 en distintas especies del género *Pseudomonas* (76) y en especies de *Azotobacter* (4), siendo 90 secuencias analizadas en total. Se encontró que la distribución de estas cinasas no es homogénea en el grupo de las *Pseudomonadaceae* y que probablemente estas proteínas no formen parte del *core* compartido de genes entre ambos grupos bacterianos. Además de que, si bien la conservación de esta cinasa tiene rango bajos de identidad y cobertura en la mayoría de los casos, los dominios 7TMR DISMED son ubicuos en este tipo de cinasas.

# Introducción

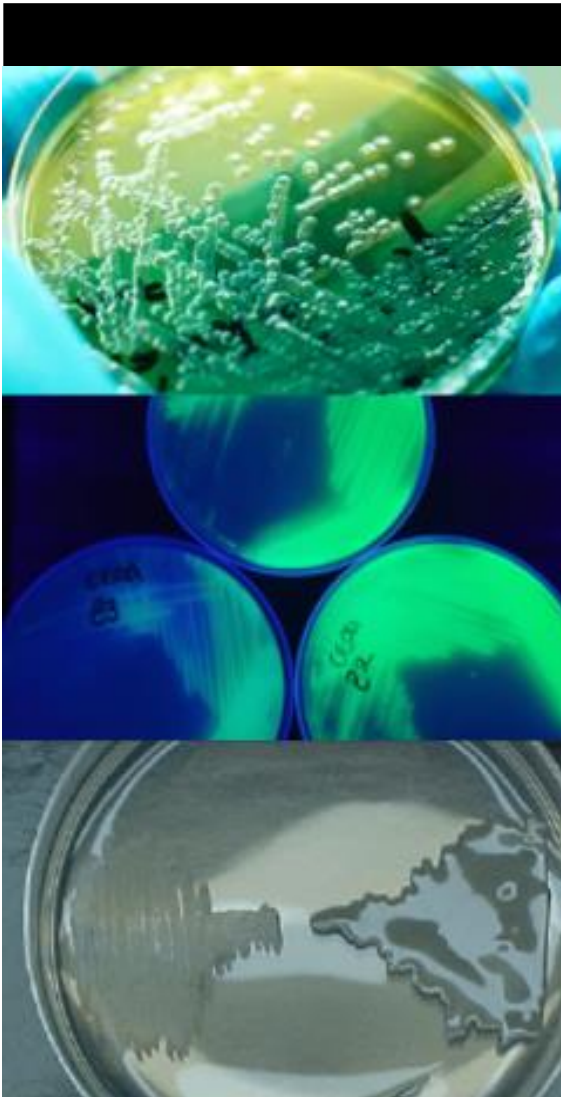


Figura 1: Especies de la familia *Pseudomonadaceae*: *P.aeruginosa*, *P. flourescens*, *Azotobacter vinelandii*

El grupo de las *Pseudomonadaceae* es una familia grande e importante de bacterias gram negativas. Son organismos ampliamente distribuidos a través de distintos nichos ecológicos e incluyen a los géneros *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Rhizobacter*, *Rugamonas* y *Serpens*. También se incluyen en esta familia a miembros del reclasificado grupo *Azotobacteriaceae*, una familia de bacterias fijadoras de nitrógeno, que incluye *Azomonas* y *Azotobacter* (Figura 1).

Son organismos que tienen gran diversidad de nichos ecológicos, pueden ser encontrados en ambientes comunes como en la rizosfera o en humedales, e incluso en ambientes más extremos como hospitales.

Su diversidad les permite adaptarse a las condiciones ambientales más exigentes y soportar condiciones desfavorables causadas por factores vivos y no vivos como el oxígeno, la humedad, la temperatura alta y baja, etc. Además, su gran potencial de degradar diversos sustratos es debido a su capacidad metabólica.

Las bacterias pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae* tienen una gran importancia médica debido a la multirresistencia y a las infecciones nosocomiales relacionadas con organismos pertenecientes a este grupo taxonómico como *P. aeruginosa*. En el área biotecnología por cuestiones de biorremediación y aprovechamiento de metabolitos secundarios como *P. syringae*, *P. Putida* y *A. vinelandii*

Este grupo bacteriano muestra una particular resiliencia a distintas condiciones ambientales, lo cual seguramente se encuentra relacionado con su capacidad de percibir y responder ante el medio ambiente (Referencia). En general, las células han desarrollado varias estrategias para reconocer y responder a los diversos estímulos, la más común involucra receptores que se encuentran embebidos en la membrana celular (Alberts, 1999, Referencia). La habilidad de las bacterias de sobrevivir en hábitats específicos requiere coordinación de una expresión genética apropiada en respuesta a los cambios ambientales.

Para poder sobrevivir con la diversidad de ambientes que pueden encontrarse, las bacterias han desarrollado diversos sistemas de señalización, incluyendo a los sistemas de dos componentes (TCS) que monitorean estímulos internos y externos (nutrientes, iones, temperatura, etc.) y traducen estas señales en respuestas adaptativas (Chambonnier, 2016).

# Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (SDC) funcionan como un sistema básico estímulo-respuesta, que permite a los organismos percibir y responder a los cambios del medio ambiente, se encuentran formados por dos proteínas; una histidin cinasa (HK) y un receptor de respuesta (RR). Estos sistemas de señalización son altamente refinados y se caracterizan por un diseño altamente modulado que ha logrado adaptar e integrar una amplia variedad de circuitos de señalización celular (Figura 2).

Los SDC son una familia de proteínas de transducción presentes en todos los dominios de la vida (Stock, 2000). En bacterias los sistemas de dos componentes constituyen una forma dominante de control genético en respuesta a los cambios ambientales.

Estos sistemas utilizan mecanismos de retroalimentación para responder al exterior, jugando un rol crítico en respuesta a condiciones de estrés, en distintas vías metabólicas. Son indispensables en procesos de patogénesis y simbiosis celular, además de ser necesarias para la resistencia y síntesis de agentes antimicrobianos (REFERENCIA Groisman, 2016).

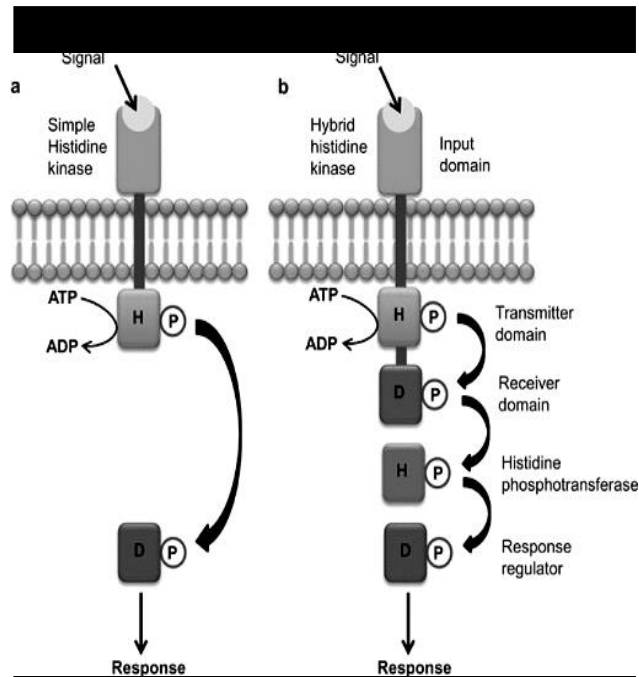


Figura 2: Las cinasas histidinas (HK) son proteínas multifuncionales típicamente transmembranales que actúan como transferasas de grupos fosfato. Pueden ser ortodoxas (a) o híbridas (b) (Ashutosh, 2017)



En SDC típicos, la HK ortodoxa o clásica monitorea estímulos externos y transmite esta información a su RR en un evento de fosforilación. Las HK se someten a una autofosforilación en un residuo de histidina en su núcleo conservado. Esta es una reacción biomolecular entre homodímeros, donde cada monómero de HK cataliza la fosforilación de su HK correspondiente (Stock, 2000).

Los estímulos ambientales son detectados directa o indirectamente por el dominio sensor de la HK. Estos dominios son diversos, pero comparten una pequeña similitud primaria. En numerosos casos, el estímulo específico y mecanismo de señalización permanece indefinido, para otros, la información estructural podría definir interacciones receptor-ligando (Bingman, 1999). Posteriormente, el grupo fosfato es transferido al RR, la mayoría de los RR son proteínas de unión al ADN que funcionan como activadores o inhibidores de la transcripción de una manera dependiente de la fosforilación (Stewart, 2010; Gao et al., 2009). Aunque en menor proporción los RR también presentan dominios de salida con actividad enzimática como: metilesterasas, adenilato ciclasas, diguanilato ciclasas, fosfodiesterasas específicas de c-di-GMP, histidina quinasa, proteína quinasa serina/treonina y proteínas fosfatasa (Galperin, 2010). La fosforilación usualmente aumenta la afinidad del regulador a su DNA blanco, aunque existen reguladores que carecen de dominios de unión a DNA por lo que establecen interacciones directas con RNA o proteínas (Groisman, 2016).

La naturaleza modular de estas proteínas permite una arquitectura que puede ser adaptada a las funciones necesarias para cada sistema específico. Miembros de la familia de las HKs varían en su tamaño desde <40Da hasta >200 kDa, a pesar de su diversidad, las HKs solo pueden ser divididas en híbridas y ortodoxas. Las cinasas híbridas son sistemas más elaborados que contienen múltiples sitios de fosfotransferencia, en lugar de promover una única reacción de fosforilación, utilizan múltiples reacciones en cascada, permitiendo una regulación con puntos de control diferentes (Stock, 2000).

La mayoría de las respuestas están asociadas con el control de la expresión genética, utilizando la habilidad de fosforilación y defosforilación de las HKs, además de la capacidad de los RR de reconocer y unirse a secuencias específicas de DNA que influyen su transcripción. De esta manera, los sistemas de dos componentes intervienen

en redes complejas en el control de la expresión genética de otros factores regulatorios, incluyendo reguladores transcripcionales y pequeños RNAs reguladores (sRNAs) (Valverde y Haas, 2008).

Se ha demostrado que en la mayoría de los SDC la interacción entre proteínas relacionadas es altamente específica, previniendo así señales cruzadas entre SDC (Laub M, 2007). Sin embargo, interacciones dominio-dominio entre HKs híbridas es menos precisa en comparación de la interacción entre proteínas de HKs y su receptor de respuesta, esto es debido a que el anclaje de los dominios transmisor y receptor en una proteína aumenta la concentración efectiva de cada dominio en la vecindad del otro (Ortet, 2021). Aunque las proteínas típicas de los SDC codificadas en genes adyacentes son frecuentes, también existen HKs y RRs aislados (huérfanos).

El paradigma del par regulador HK-RR recientemente ha sido cuestionado con la existencia de sistemas que poseen dos o más HKs que controlan el estado de fosforilación de un RR, pero solo una de ellas fosforila directamente al RR. Ya sea individualmente o en conjunto, las HKs accesorias estimulan o bloquean la actividad de cinasa de la HK principal. A estos sistemas de transducción de señales se les ha llamado sistemas de multicomponentes y su estudio se ha convertido en un área novedosa y de frontera en los estudios de fisiología y señalización en procariotas.

# Sistema de dos componentes: GacS/GacA

GacS es una HK no ortodoxa con dominios H1/D1/H2. GacA es un RR que funciona como un regulador transcripcional el cual regula positiva y exclusivamente la expresión de genes que codifican a pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm (*Regulator Secondary Metabolism*) (Romeo, 1998). Estos sRNAs reguladores secuestran a la proteína RsmA, la cual funciona como un regulador transcripcional al estar unida a sus genes blanco, bloqueando su traducción y promoviendo su degradación (Lapouge et. al, 2008). Los sRNAs-Rsm contrarrestan la actividad represora de RsmA secuestrándola, permitiendo la traducción de los RNAm sujetos a regulación (Figura 3) (Heeb, 2001; Vakulskas, 2012).

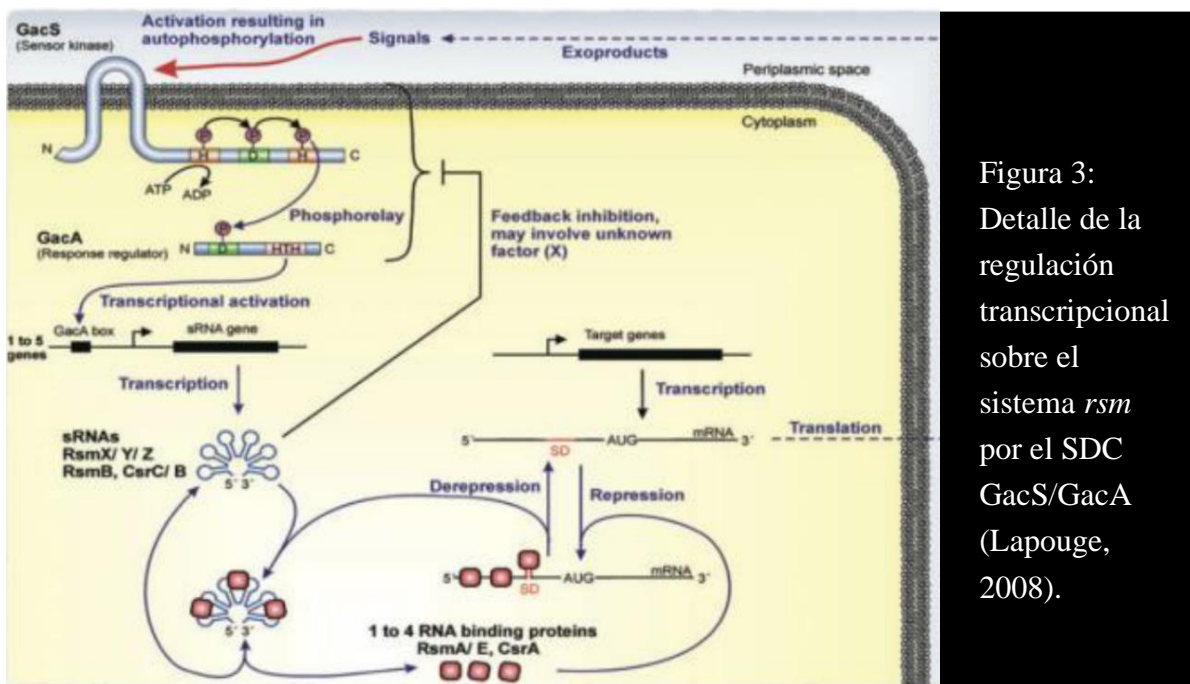


Figura 3: Detalle de la regulación transcripcional sobre el sistema *rsm* por el SDC GacS/GacA (Lapouge, 2008).

La cinasa sensor GacS fue descrita por primera vez en *P. syringae* como un factor esencial para la manifestación de lesiones en hojas de frijol en su cepa patogénica (Hrabak, 1992). El regulador de respuesta GacA fue descrito por primera vez en *P. fluorescens* como un activador global de producción de antibiótico (Parkins, 2001). Se han identificado cerca de 20 homólogos de GacS y GacA en bacterias entéricas (*E.coli*, *Salmonella enteérica* y *Erwinia carotovora*) y también en miembros del grupo de las *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, *Vibrio* y *Azotobacter*). En general, estos homólogos han sido encontrados por mutaciones nulas en los genes correspondientes con fenotipos característicos. Un común denominador de este sistema es que está involucrado en la síntesis de metabolitos secundarios (Altier, 2000; Gaffney, 1994).

Citando algunos ejemplos de la regulación transcripcional de este SDC, se puede mencionar a la toxina colérica y el pili coregulador, los cuales dependen del homólogo de GacA para su expresión en *Vibrio cholerae* (Lucas, 2001). En *S. enteérica* serovar *Typhimurium* una proteína homóloga a GacA, regula positivamente al sistema de secreción tipo III y funciones invasivas al hospedero (Ahmer, 1999; Goodier y Ahmer 2001). En *A. vinelandii*, una bacteria fijadora de nitrógeno que tiene la capacidad de formar estructuras resistentes a la desecación. El sistema GacA/GacS regula la génesis de estas estructuras, así como la producción de alginato (Castañeda, 2000).

# LadS y RetS: Cinasas accesorias en el SDC

## GacS/GacA

Goodman en 2004 al generar mutantes en *P. aeruginosa*, encontró que la mutante en PA4856 tenía un fenotipo hiperadhesivo. Al caracterizarla encontró que la ausencia de esta proteína inducía mayor generación de biofilm, aumento en unión a células del hospedero en comparación a la cepa silvestre y pérdida de citotoxicidad en modelo murino. Goodman nombró a esta proteína como RetS.

RetS carece de dominios de unión de DNA característicos de proteínas reguladoras, por lo que se asumió que era parte de una red reguladora. Al realizar mutagénesis por transposones para identificar a los componentes adicionales involucrados en la transducción de señales de RetS, se encontró que esta proteína estaba involucrada con la vía regulatoria GacS/GacA. RetS es una cinasa sensor inusual que contiene un dominio sensor periplasmático unido por siete segmentos transmembranales (Goodman, 2004).

En *P. aeruginosa* RetS modula el estado fosforilación de GacS mediante la interacción directa y específica con esta cinasa. RetS forma heterodímeros con GacS, bloqueando la autofosforilación de GacS y la posterior fosfotransferencia al regulador de respuesta GacA que conduce a la reducción de la expresión de *rsmZ* (Goodman et al., 2009).

La cepa PA14 de *P. aeruginosa*, la cual fue originalmente aislada de una herida de quemadura, tiene una mutación en *ladS* y muestra virulencia aguda, que es atribuida a esa mutación. LadS es una cinasa sensor similar estructuralmente a RetS, pero que actúa de manera contraria, se ha observado que mutantes en *ladS* permanecen en estado planctónico en condiciones donde cepas silvestres realizan una transición de un estado planctónico a uno sésil. Esto sugiere que este gen podría mediar la transición entre ambos estilos de vida bacterianos (Mikkelsen, 2011). LadS comparte semejanzas estructurales, así como blancos genéticos con RetS. Ambas cinasas contienen un sensor periplasmático 7TMR-DISMED2, con un modesto 35% de identidad en la secuencia de aminoácidos, sugiriendo que se unen a ligandos similares. Se ha predicho que este dominio se une a carbohidratos y está asociado con dominios transmembranales (Anantharaman, 2003).

Además de RetS y LadS, se ha encontrado que la HK híbrida PA1611 induce la expresión de los genes *rsm* al interactuar con RetS y GacS (Kong, 2013), siendo tres las HKs conocidas que interactúan con el sistema GacS/GacA. La manera en la que funcionan estas cinasas híbridas se ha descrito en estudios recientes; se sabe que RetS reprime la expresión de ambos genes *rsmY* y *rsmZ* al interferir con la actividad del sistema de dos componentes GacS/GacA (Goodman, 2009). De manera interesante, así como la función de GacS es bloqueada al interactuar con RetS, la actividad de RetS es inhibida al heterodimerizar con una HK: PA1611 (Chambonnier et al., 2016). La HK híbrida LadS, que contiene dominios H1/D1, ha demostrado activar la expresión de los genes *rsmZ* (Bordi, 2007), y también es capaz controlar de manera recíproca los genes blanco de RetS (Ventre, 2006). En la Figura 4 se muestra el detalle de todas estas interacciones conocidas.

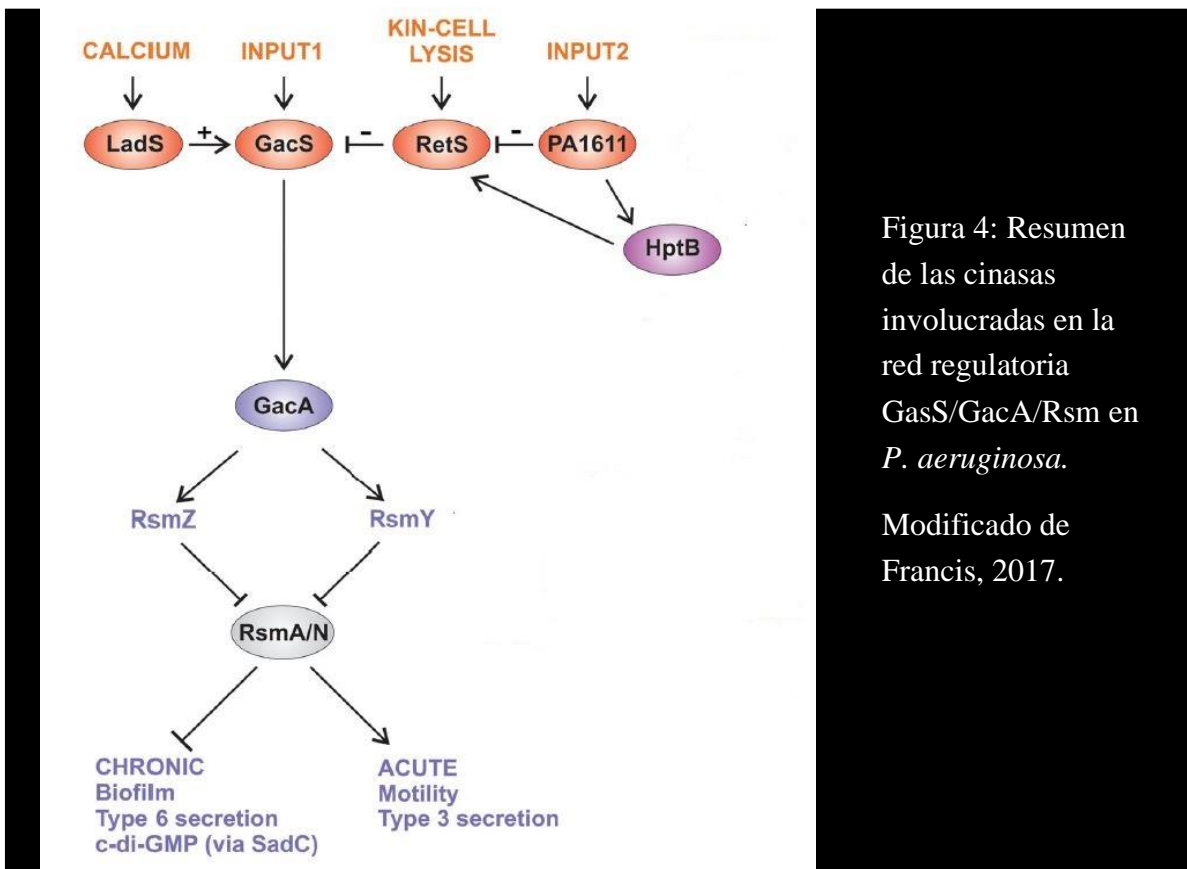


Figura 4: Resumen de las cinasas involucradas en la red regulatoria GacS/GacA/Rsm en *P. aeruginosa*.

Modificado de Francis, 2017.

En *P. fluorescens* se ha propuesto que LadS controla la expresión de *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* a través de GacS, esto basado en la observación de que mutaciones en *gacS* o *gacA* son epistáticas a la mutación en *ladS* (Humair, 2009).

Es importante mencionar que existen sensores híbridos, que a menudo median la transducción de señales a través de proteínas o dominios de fosfotransferencia histidínica (Hpt). Es posible que RetS y LadS controlen la expresión de los sRNAs reguladores al regular el estado de fosforilación de un Hpt aún no identificado que controla al regulador de respuesta (Ventre, 2005).

# Estructura de las HKs GacS LadS RetS: Dominios 7TMR

Estructuralmente, LadS presenta una organización con un dominio N-terminal 7TMR-DISMED2 (7TM *Diverse Intracellular Signalling*), seguido de un dominio 7TMR-DISM\_7TM (7TM *Receptors with Diverse Intracellular Signalling Modules*). Posteriormente se encuentra el dominio transmisor (HisKA/HATPase) y finalmente el dominio REC. Curiosamente, esta arquitectura de dominios es compartida por RetS, siendo la cinasa RetS más grande que LadS, esencialmente porque RetS posee un dominio REC adicional en su C-terminal (Ventre *et al.*, 2006).

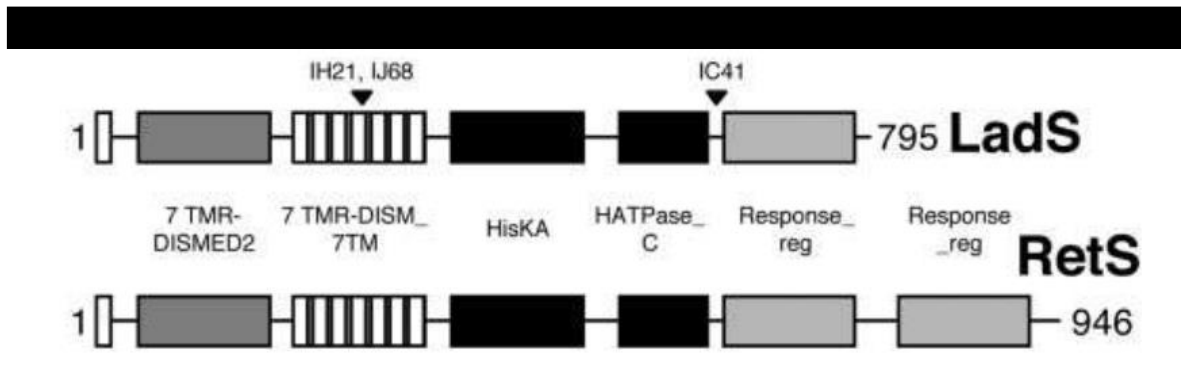


Figura 5: Estructura de las cinasas LadS y RetS (Ventre *et al.*, 2006).

Los dominios 7TMR son una clase amplia de receptores de membrana caracterizada por 7 segmentos transmembranales, su estructura aparentemente posee gran flexibilidad, lo cual permite censar gran diversidad de ligandos (Mombaerts, 1999). En animales, los 7TMR funcionan vía proteínas G, donde responden a distintos efectores como adenil ciclasas, fosfolipasas y canales iónicos. En hongos activan vías de señalización Ras. La gran diversidad de la arquitectura de los dominios proteicos 7TMR DISM, particularmente en términos de sus módulos intracelulares, sugieren que activan una variedad de señales en respuesta a diferentes ligandos externos.



El tamaño promedio del dominio 7TMR DISMED y su distribución coinciden con varios dominios de unión a carbohidratos como discoidina, celulosa y fucosa, esto implica que este dominio pudiera funcionar como un sensor de carbohidratos o ligandos relacionados. La arquitectura de los dominios 7TMR DISM sugiere que activan una variedad de cascadas de señalización, incluyendo adenil ciclasas y cinasas, esto indica que probablemente que estos dominios sean análogos funcionales de los receptores eucarióticos, pudiendo funcionar como modelos de vías no relacionadas con proteínas G en receptores eucarióticos. Estos dominios son reminiscentes a receptores gustativos y glutamato metabotrópico en animales, estos receptores contienen un dominio de unión a solutos extracelular, el cual es típico de muchas estructuras proteicas de señalización bacteriana (Anantharaman, 2003).

Análisis filogenéticos sugieren que existe una historia dinámica entre estos dominios, que como en el caso de distintas proteínas de señalización celular es probable que haya existido transferencia horizontal de genes entre taxas distantes y pérdida de genes esporádica.

Muchos dominios 7TMR también contienen un *N-terminal extracellular putative ligand-binding DISMED (DISM extracellular domain)*. Un reciente estudio demostró que el dominio DISMED es reemplazable en la función de la HK. En contraste, la delección de 6 de 7 TMR del dominio 7TMR DISM resulta en una proteína trunca que, aunque se logra anclarse a la membrana citoplasmática no es capaz de complementar a la mutante en *retS*. Subrayando así la importancia de los segmentos transmembranales para la percepción de señales en las cinasas (Laswkoski, 2006).

Las HKs LadS, RetS y GacS comparten en común la presencia de este dominio estructural. Sin embargo, mientras el sistema de dos componentes GacS/GacA está ampliamente distribuido en distintas especies bacterianas, el interruptor molecular formado por las cinasas LadS, PA1611 y RetS es único en especies del género *Pseudomonas* con una sola excepción conocida; el género *Azotobacter*, siendo *A. vinelandii* la especie donde se han encontrado homólogos estructurales para estas cinasas.

## *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria gram negativa fijadora de nitrógeno que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Bajo condiciones ambientales adversas tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente generando formas celulares latentes resistentes a la desecación denominadas quistes (Segura *et al.*, 2014). Posee un metabolismo secundario bastante versátil, tiene la capacidad de producir metabolitos de interés biotecnológico como alginatos, poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), sideróforos y alquilresorcinoles (ARs). Es una bacteria poliploide, es decir posee varias copias de su cromosoma, y se calcula una célula puede tener hasta 80 copias. El número de copias varía dependiendo del medio y las condiciones de cultivo, así como de la fase de crecimiento. Es de tamaño muy grande, de 2x5 nm de diámetro, es decir, de 5 a 10 veces el volumen de *E. coli*. Se ha asociado el tamaño con la poliploidía.

Las capacidades metabólicas y genéticas por las que *A. vinelandii* ha sido y es objeto de estudio son principalmente: Fija nitrógeno en presencia de oxígeno por tres sistemas diferentes de nitrogenasa, posee mecanismos de protección de la nitrogenasa, tiene una alta capacidad respiratoria que en condiciones diazotróficas, o de fijación de nitrógeno, produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato, y sufre un proceso de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación (Espín, 1999).

En *A. vinelandii* el SDC GacS/A en conjunto con el sistema Rsm controla la biosíntesis de alginatos (Castañeda *et al.*, 2001; Manzo *et al.*, 2011). Este sistema regula la biosíntesis de alginato mediante el control postranscripcional del gen de alginato, *algD*, a través del sistema Rsm. GacA activa la transcripción de siete sRNAs (RsmZ1-7) que contrarrestan la actividad represora de la proteína RsmA que se une al mRNA *algD*, previniendo su traducción (Manzo *et al.*, 2011). También, este SDC regula la producción de PHB (Hernandez-Eligio *et al.*, 2002), la síntesis de sideróforos (Datos no publicados) y la producción de ARs (Romero *et al.*, 2016).

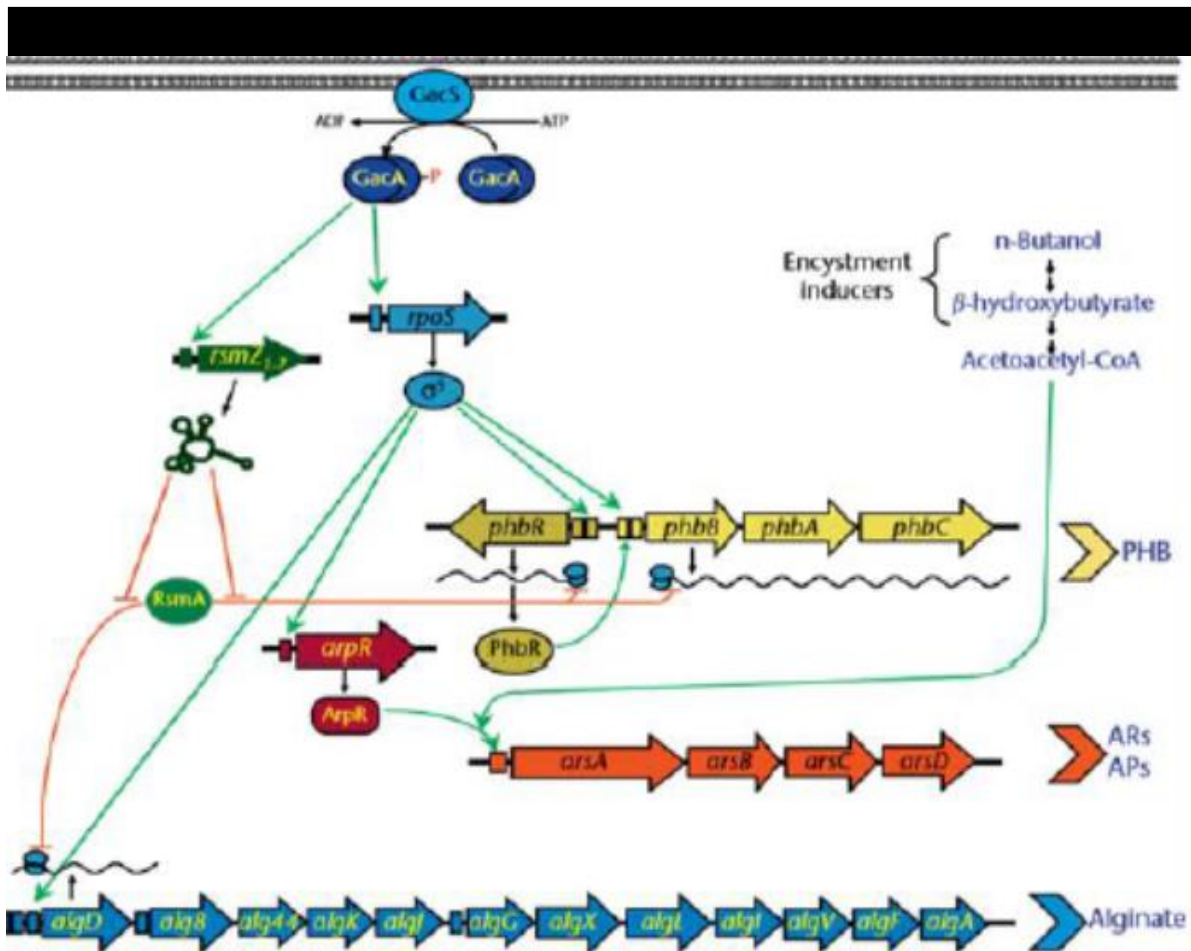


Figura 6: Detalle de la red transcripcional GacS/GacA en *A. vinelandii*. Se muestran los fenotipos regulados por este SDC; PHB, Alquilresorsinoles y alginato (Segura, 2014).

# *Azotobacter vinelandii*: ¿Una *Pseudomonas* disfrazada?

La presencia de las cinasas LadS y RetS no son la única cosa en común que comparten estas dos especies de bacterias del grupo de las *Pseudomonadaceae*. En 2004, Rediers publica un escrito donde explica que *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* comparten mayor identidad (96%) entre sus secuencias de 16S que incluso otras especies dentro de la familia de las *Pseudomonas*. La comparativa no solo se limita a este marcador, al analizar una serie de proteínas con funciones constitutivas (GyrB, RecA, RpoD, etc.). Se encontró que las proteínas de *A. vinelandii* estaban más relacionadas con *P. aeruginosa* que otras especies del mismo género.

Estos datos sugerían que *A. vinelandii*, en sentido estricto, pertenecía al género *Pseudomonas*. Sin embargo, con pocas secuencias completas de las *Pseudomonadaceae* en esa época y siendo *Pseudomonas* el género más complejo y diverso de las gamma proteobacterias con más de 220 especies descritas hasta el año 2020 (Lalucat, 2020), era prematuro para sacar conclusiones.

Özen y Ussery en 2010 retoman los estudios de Rediers y al realizar análisis filogenéticos con el marcador 16S, confirma que *A. vinelandii* tiene mayor cercanía con *P. aeruginosa*. Para comprobar la cercanía filogenética entre estas bacterias, realizan estudios comparativos de pangenoma y coregenoma, donde encuentran que, si bien existe un coregenoma entre *A. vinelandii* y la familia de las *Pseudomonas*, también existen diferencias significativas entre el pangenoma de ambos grupos bacterianos.

Nueve años después, con más de 21 800 secuencias disponibles en NCBI y mayor entendimiento y disponibilidad de los recursos de análisis de genomas y bioinformática, Martínez-Carranza publica un estudio comparativo de genes esenciales de dos cepas de *P. aeruginosa* (PAO1 y PA14) y *A. vinelandii* DJ. Ellos encontraron que de 342 genes esenciales de la cepa PAO1, solo 10 genes no se encuentran presentes en *A. vinelandii*. Además, los genes que sí se comparten entre ambas especies, tienen un 80% de similitud (Martínez-Carranza, 2019).

La estructura general del cromosoma de *A. vinelandii*, comparado con *P. aeruginosa* indica que existe una “columna vertebral genómica” donde estos genes esenciales comparten el mismo contexto genómico (sintenia). Sin embargo, las zonas que no comparten esta sintenia no pueden ser consideradas islas genómicas, ya que el contenido de CG no es diferente al resto del genoma, además de que solo existen 10 islas genómicas reportadas para *A. vinelandii* (González, 2014).

En 2020 Lalucat publica el estudio taxonómico más reciente para el género *Pseudomonas*, donde *Azotobacter* nuevamente aparece embebido entre los clados de este grupo bacteriano al realizar análisis con ARNr 16S y MSLA (*Multilocus sequence analysis*). Sin embargo, al realizar un estudio comparativo de proteínas conservadas POCP (*Analysis of the percentage of conserved proteins*). *Azotobacter* queda fuera del género *Pseudomonas* con solo un 45% de similitud en comparación a otras especies del género.

Es indiscutible que *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* tienen una serie de características genéticas en común. Además de que comparten a las cinasas accesorias RetS y LadS en el SDC GacS/GacA, donde la regulación del sistema se da de manera similar. Probablemente conocer la distribución de estas cinasas en este género pueda aportar evidencia al origen polifilético de *Azotobacter* a partir de un ancestro en común con *Pseudomonas* y se pueda conocer si estas proteínas forman parte o no del núcleo genético entre ambos grupos bacterianos.

# Antecedentes

En la notación del genoma de la cepa DJ de *A. vinelandii* está presente el sistema GacS/GacA (Castañeda *et al*, 2000). Al buscar a las cinasas accesorias de este sistema, se encontró que el gen Avin 06870 presenta un 48% de identidad con la cinasa RetS de *P. aeruginosa*, pero no se encontró un homólogo del gen *ladS*. Al iniciar la búsqueda del homólogo putativo del gen *ladS* se usó como patrón de comparación el gen correspondiente de *P. aeruginosa*. De acuerdo con la búsqueda en la anotación del genoma el resultado fue negativo, por consiguiente, se usó como patrón de búsqueda la secuencia de aminoácidos. Al realizarlo de esta manera, se encontró un homólogo putativo (Avin 34990) con un 34% de identidad y con todos los dominios característicos de la cinasa (Cruz, 2012).

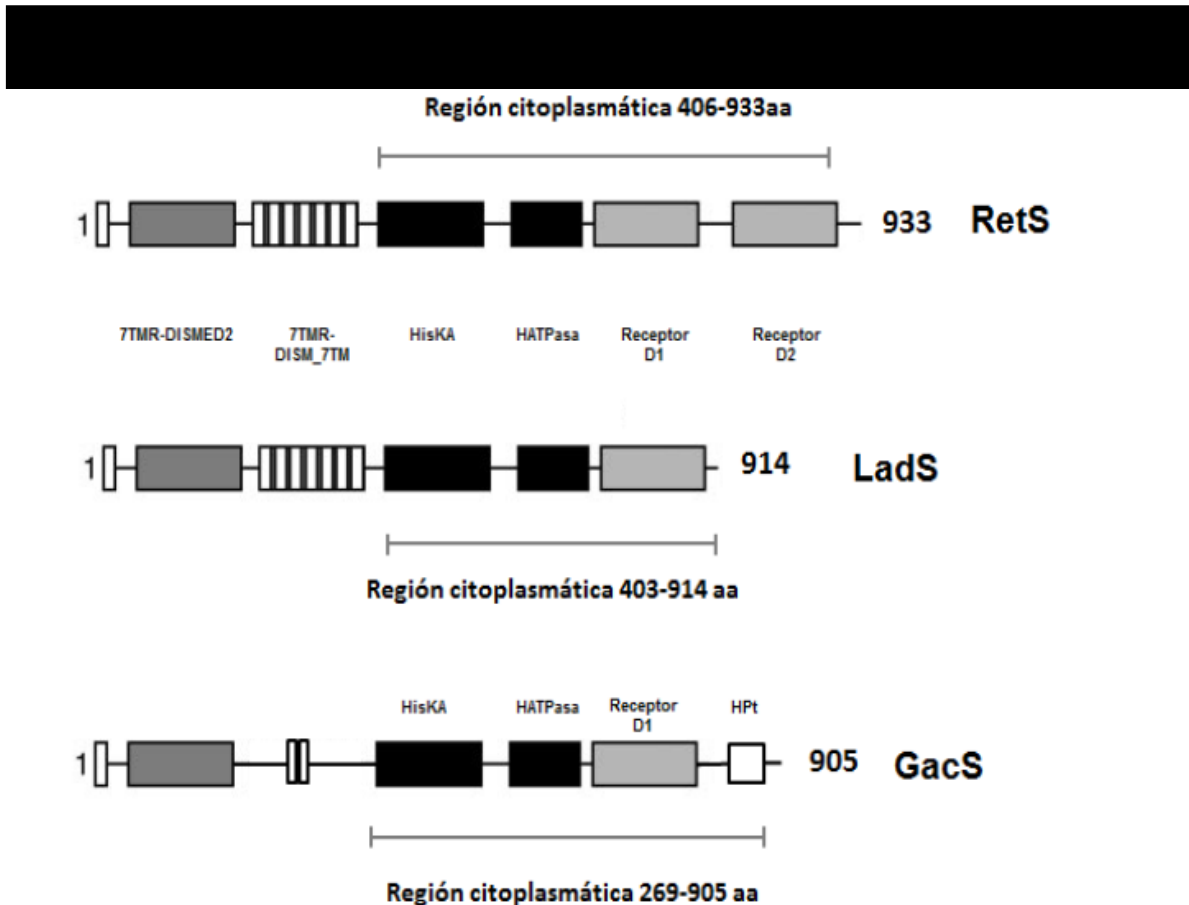


Figura 7: Detalle estructural de las cinasas híbridas RetS, LadS y GacS (Cruz, 2012).

Es importante mencionar que en la cinasa LadS de *A. vinelandii* el dominio N terminal 7TMR-DISMED y el dominio 7TMR-DISM\_7TM se encuentran conservados, lo que podría indicar que al igual que en *P. aeruginosa*, LadS también podría activarse por calcio (Dasgupta et al., 2006). El calcio, por tanto, podría estar implicado en la regulación de la producción de alginato.

Debido a que en *P. aeruginosa* las cinasas LadS y RetS modulan la actividad del sistema Gac/Rsm. En el laboratorio se realizó un ensayo de doble híbrido cualitativo para establecer las relaciones entre estas cinasas en *A. vinelandii*. Este ensayo utiliza al sistema LexA que evalúa la interacción de proteínas en un fondo de *E. coli*. Este método aprovecha la naturaleza de la proteína represora LexA, la cual consta de dos dominios, uno que reconoce y se une a un sitio operador específico en el ADN y otro que funciona como un dominio de dimerización. El dominio de dimerización LexA puede eliminarse y reemplazarse con otra proteína o fragmento de proteína que de manera putativa interactúan. Debido a que el represor está activo solo como un dímero, la dimerización de las proteínas probadas permitirá que el LexA quimérico se una a su sitio de operador y reprima la transcripción del gen reportero *lacZ*, lo que genera un fenotipo lactosa negativo.

En este trabajo se clonó la región citoplasmática de GacS y RetS y por otra parte la región citoplasmática de GacS y LadS; demostrando que la cinasa RestS interactúa con GacS, como sucede en *P. aeruginosa*. Sin embargo, no se observó interacción entre las cinasas LadS y GacS (Sánchez, 2012).

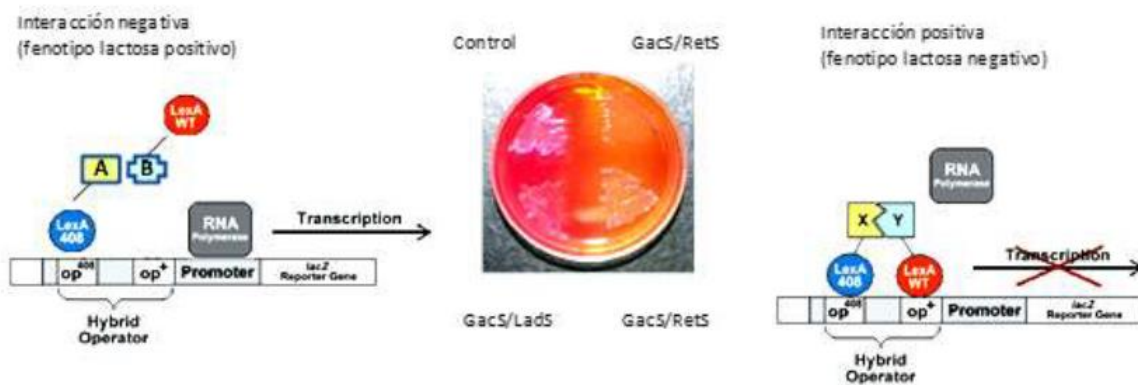


Figura 8: Ensayo de doble híbrido cualitativo para establecer las relaciones entre las HKs dentro del sistema de Gac/Rsm en *A. vinelandii* (Sánchez, 2012)

Para estudiar la regulación ejercida por las cinasas LadS y RetS sobre los RsmRNAs, en el laboratorio se construyeron mutantes *retS* y *ladS*. Como un primer acercamiento se evaluó el efecto en los fenotipos regulados por el sistema Gac/Rsm. Se observó que la mutante *retS* disminuía la producción de alginato, alquilresorcinoles y pioverdinas y la mutante *ladS* la aumentaba, sugiriendo que RetS funciona como un regulador positivo y LadS como un regulador negativo (Reyes, 2018). Estos datos sugieren que en *A. vinelandii* RetS estaría funcionando como LadS y LadS como *RetS* en comparación con *P. aeruginosa*.

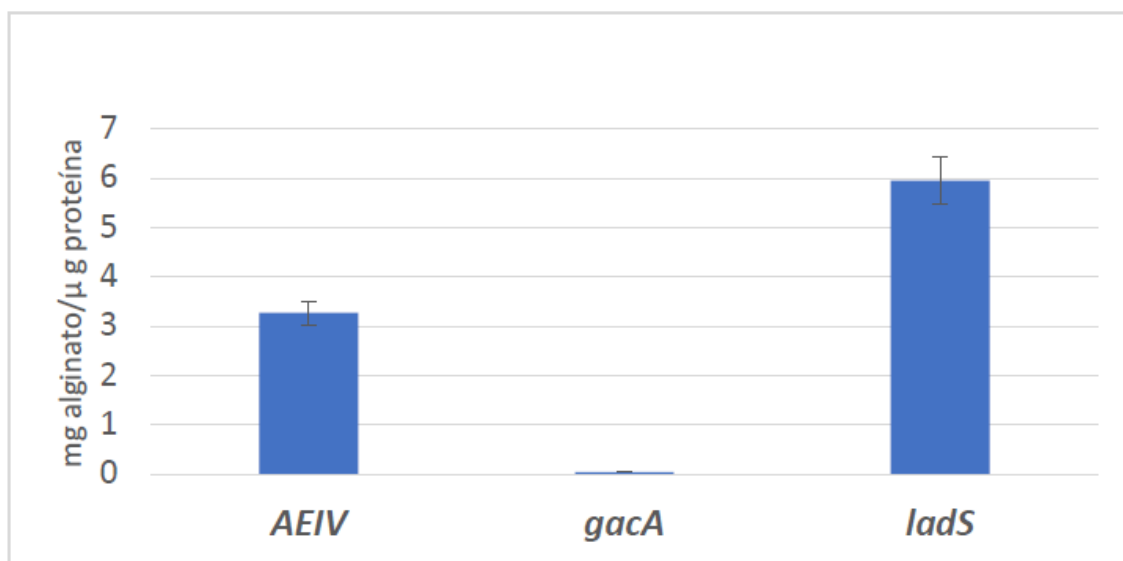


Figura 9: Cuantificación de alginato de las cepas AEIV, AEIVΔ*gacA* y AEIVΔ*ladS* (Reyes-Nicolau, 2018).

Esto se confirma con el trabajo realizado por Acocal y García en 2020 donde concluyen que LadS regula la síntesis de alginato a través del sistema GacS/GacA Rsm en *A. vinelandii*, donde la presencia de GacS es necesaria para que LadS ejerza su efecto regulador sobre la síntesis de alginatos y expresión de los sRNAs. García (2020) evaluó todos los *rsm*-sRNAs para establecer el efecto de LadS en cada uno de ellos. En este sentido, es importante mencionar que *A. vinelandii*, con ocho *rsm*-sRNAs, es la bacteria con mayor cantidad de copias reportadas (López-Pliego et al, 2018).



En este trabajo se evaluó el efecto de la mutación *ladS* sobre la expresión de los genes *rsmZ1-7* y *rsmY*, donde se observó, que de manera general existe un aumento en la expresión de los *rsmS*-sRNAs (Garcia, 2020). Sin embargo, se encontró que por medio del sistema de doble híbrido LexA no se detecta interacción entre las cinasas LadS y GacS (Acocal, 2020). En modelo de *P. aeruginosa* tampoco se detectó heterodimerización entre estas proteínas con este método (Chambonnier et al., 2016).

# Justificación

Las redes multicinasas son un área novedosa y de frontera en los estudios de transducción de señales en procariotes. Es importante destacar que, no existen estudios en la actualidad enfocados a la diversidad y distribución de este sistema multicinasa entre ambas familias de microorganismos. El estudio de estos sistemas multicomponente puede proveer modelos para el estudio de funciones importantes en proteínas eucarióticas y procariotes patógenos como *P. aeruginosa* o de interés biotecnológico como *A. vinelandii*.

Además, el conocer la distribución de estas cinasas en grupos bacterianos tan relacionados como lo son *Azotobacter* y *Pseudomonas* puede proveer información sobre las semejanzas y diferencias entre las proteínas de señalización de estos microorganismos. Incluso podría proveer evidencia sobre el origen polifilético de *Azotobacter* al conocer la presencia y conservación de estas cinasas.

# Objetivos

## General

- Estudiar la histidin cinasa LadS2

## Particulares

- Determinar la distribución de LadS1 y LadS2 en el género *Pseudomonas*.
- Comprobar la semejanza estructural y conservación de dominios 7TMR DIMS

# Resultados

Se realizaron alineamientos en BLAST de la secuencia de aminoácidos de LadS1 y LaS2, acotando solo a la familia *Pseudomonadaceae*. De manera interesante en los alineamientos con mayor identidad y cobertura no se encontraron a las especies de *Pseudomonas* más estudiadas, si no a especies de reciente identificación de las cuales existe poca información disponible. De izquierda a derecha los parámetros evaluados son los siguientes: Puntaje máximo, Puntaje total, Cobertura, Valor *E* y Porcentaje de identidad. (Figura 6).

Alineamientos LadS1 en <i>Pseudomonas</i>						
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter vinelandii]	1580	1580	100%	0.0	99.87%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter vinelandii]	1577	1577	100%	0.0	99.75%
<input checked="" type="checkbox"/>	Signal_transduction_histidine_kinase [Azotobacter vinelandii]	1577	1577	100%	0.0	99.75%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter vinelandii]	147	147	79%	3e-36	28.77%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter chroococcum]	134	134	81%	6e-32	27.29%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter beijerinckii]	134	177	44%	6e-32	33.80%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Azotobacter beijerinckii]	134	177	44%	6e-32	33.80%

Alineamientos LadS2 en <i>Azotobacter</i>						
<input checked="" type="checkbox"/>	Signal_transduction_histidine_kinase [Azotobacter vinelandii]	1577	1577	100%	0.0	99.75%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Pseudomonas salegens]	763	763	97%	0.0	52.97%
<input checked="" type="checkbox"/>	Signal_transduction_histidine_kinase [Pseudomonas salegens]	762	762	97%	0.0	52.90%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Pseudomonadaceae bacterium P28C]	757	757	96%	0.0	54.38%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Pseudomonadaceae bacterium P28C]	756	756	96%	0.0	54.38%
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES_hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [unclassified Pseudomonadaceae]	755	755	96%	0.0	54.38%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Pseudomonadaceae bacterium P17C]	754	754	96%	0.0	54.38%
<input checked="" type="checkbox"/>	hybrid_sensor_histidine_kinase/response_regulator [Pseudomonas celagii]	749	749	97%	0.0	53.29%

Figura 6: Detalle de los alineamientos realizados en BLAST para *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Se hizo una selección de todas las secuencias que tuvieran al menos un 45% de cobertura y un 75% de identidad y se generaron arboles filogenéticos para observar la cercanía de cada cinasa en las distintas especies del género *Pseudomonas*. Estos análisis se realizaron en el software Mega X con el método de *Neighbor Joining* con 500 *bootstraps*.

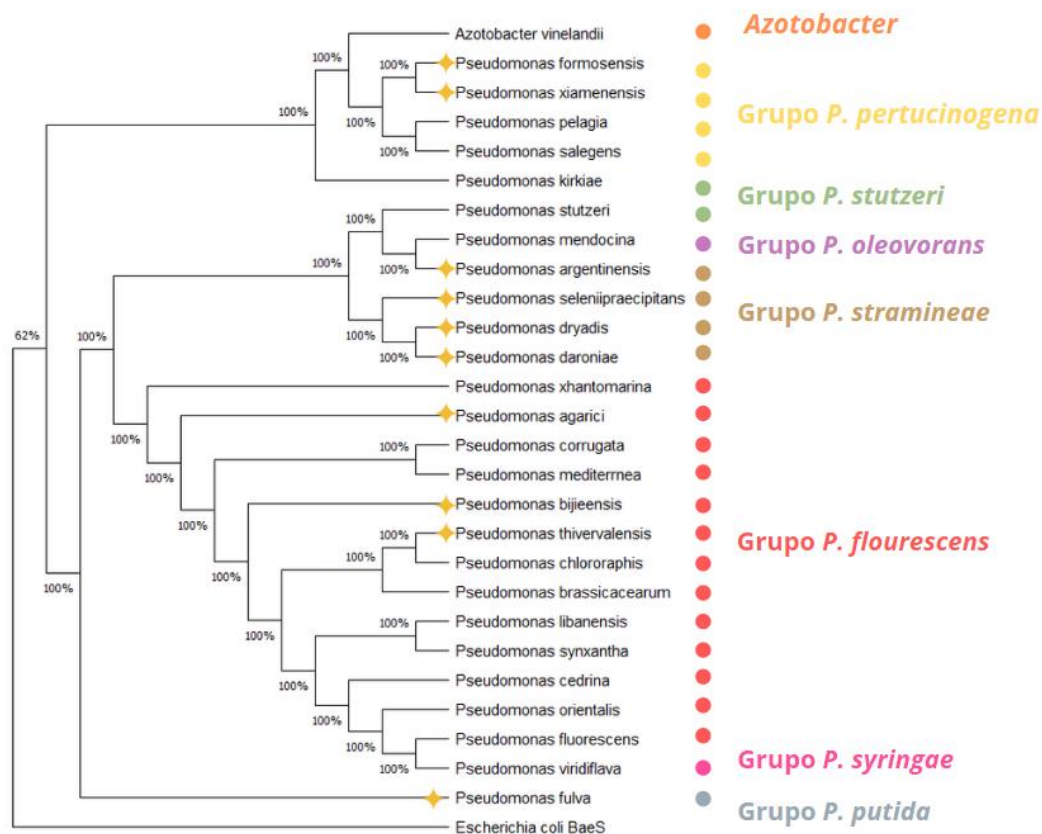


Figura 10: Cladograma de LadS1, en colores se muestran los grupos clásicos del género *Pseudomonas*. ✦ Esta marca indica especies descritas en los últimos 20 años.

En el cladograma generado a partir de la secuencia de aminoácidos de LadS1 (Figura 10), se puede notar que *Azotobacter vinelandii* también aparece embebido en el clado de *P. pertucinogena*. De manera interesante, la secuencia de LadS de *P. aeruginosa* que es la especie que se ha descrito como la más similar a *A. vinelandii*, no figura entre las proteínas más cercanas a LadS de *A. vinelandii*.

Con los mismos parámetros y tomando como referencia la secuencia proteica de LadS2, se generó un segundo cladograma (Figura 11).

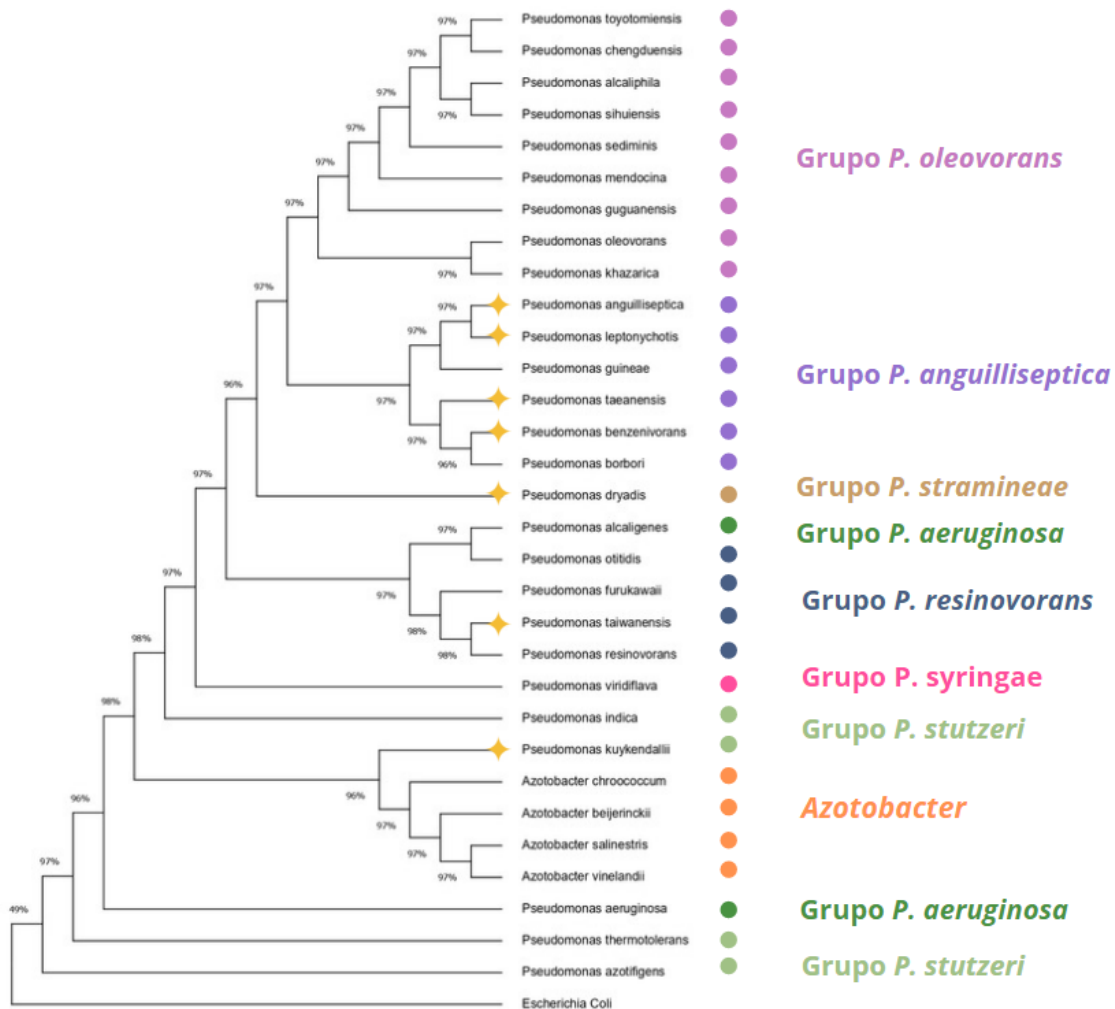


Figura 11: Cladograma de LadS2, en colores se muestran los grupos clásicos del género *Pseudomonas*.

En el cladograma generado a partir de la secuencia en LadS2, se encontraron más secuencias similares a LadS2 tanto en *Pseudomonas* como en *Azotobacter*. Esto indica que LadS2 presenta mayor distribución que LadS1. De igual manera que con el cladograma anterior, no se encontró un homólogo inmediato para LadS2 en *P. aeruginosa*.

Posteriormente se hicieron alineamientos a partir de la secuencia nucleotídica del marcador 16S en *A. vinelandii* para realizar un cladograma en donde se visualizaron las especies más cercanas. Tomando esta lista de especies como base, se logró identificar la distribución de las cinasas LadS1 y LadS2 (Figura 12).

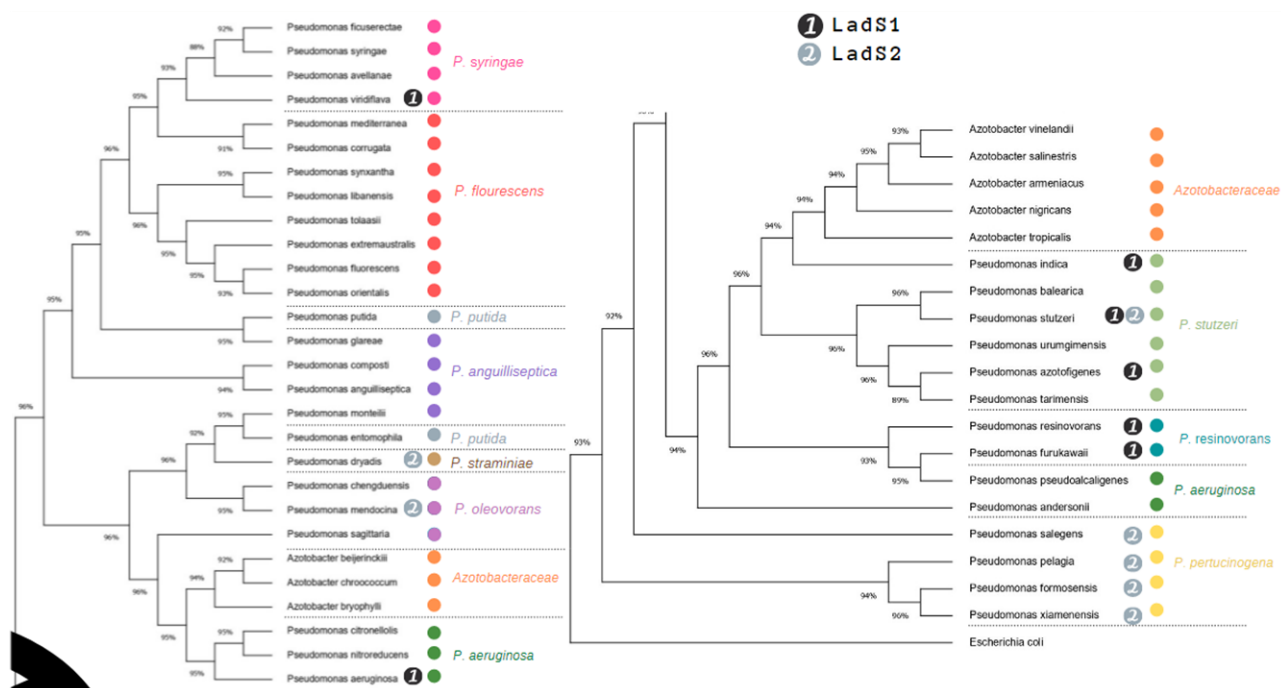


Figura 12: Cladograma generado a partir del marcador 16S de *A. vinelandii*, en colores se muestran los grupos clásicos del género *Pseudomonas*. Los números en círculo representan a las cinasas LadS1 y LadS2.

En el cladograma generado se pudo observar que la distribución de ambas cinasas no es uniforme entre las distintas especies de *Pseudomonas* y *Azotobacter*, además de que no se encuentran de manera común en las especies más cercanas tomando a *A. vinelandii* como punto de comparación. De manera similar que, en estudios anteriores el grupo de las *Azotobacteraceae* se encuentra embebido en el clado de *P. aeruginosa*.

Para corroborar estos resultados, se generaron cladogramas a partir de las secuencias de distintos genes constitutivos que han sido descritos como marcadores filogenéticos. Las secuencias proteicas elegidas fueron: RecA, GyrB, RpoB y RpoD. Para este propósito se utilizaron 76 secuencias de *Pseudomonas* que fueron recabadas en total para este estudio. De igual manera que con el cladograma generado a partir del gen 16S, se realizaron alineamientos de la secuencia correspondiente a cada marcador de *A. vinelandii* y se seleccionaron 50 secuencias para la construcción de los árboles filogenéticos.

En la lista de especies generada para cada árbol filogenético, se buscó la presencia de cada cinasa (Figura 13-16).



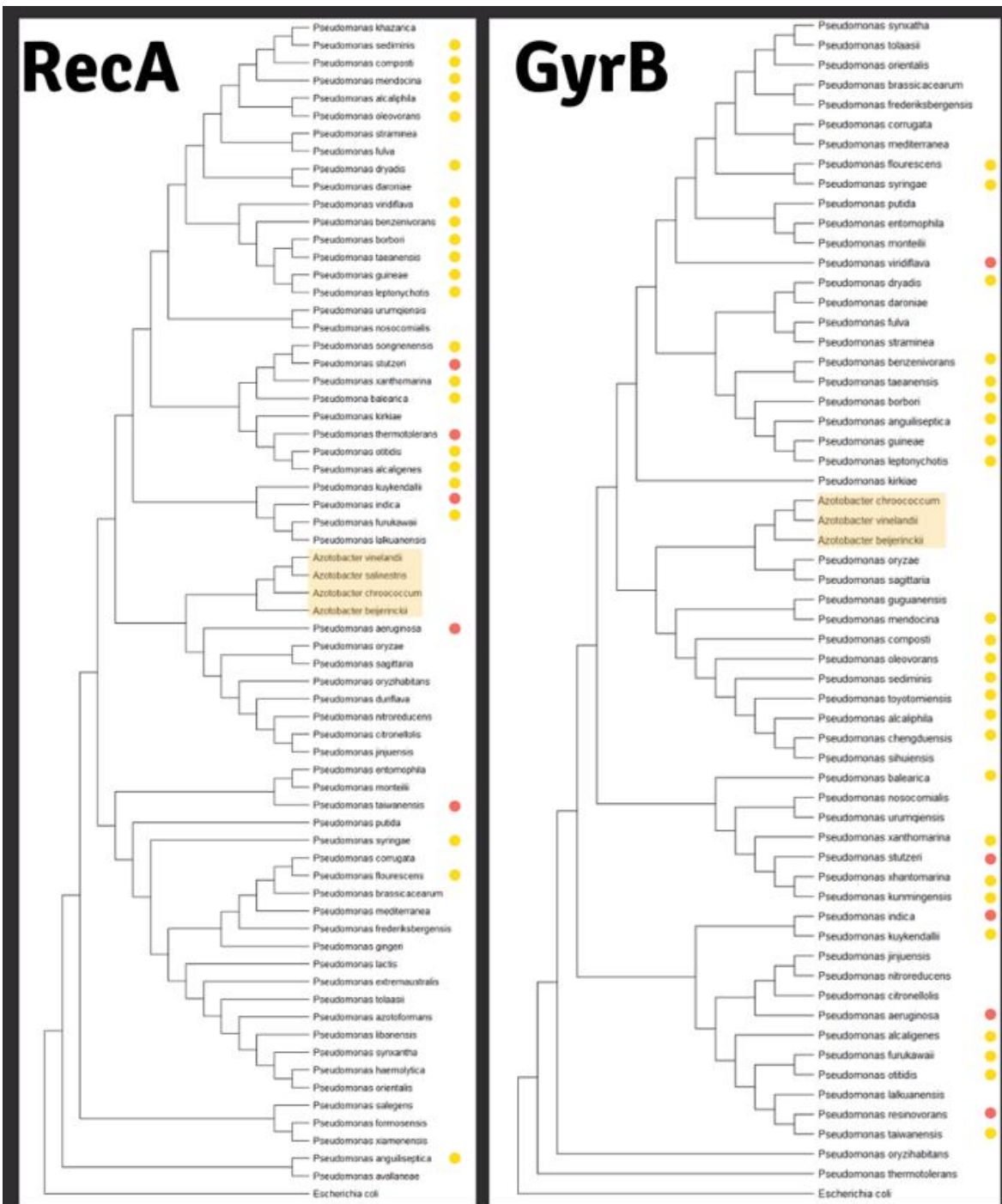


Figura 13: Cladogramas generados a partir de los marcadores RecA y GyrB. Los puntos representan la presencia de la cinasa LadS1 en cada especie. Se encuentra sombreado el grupo de *Azotobacter*.

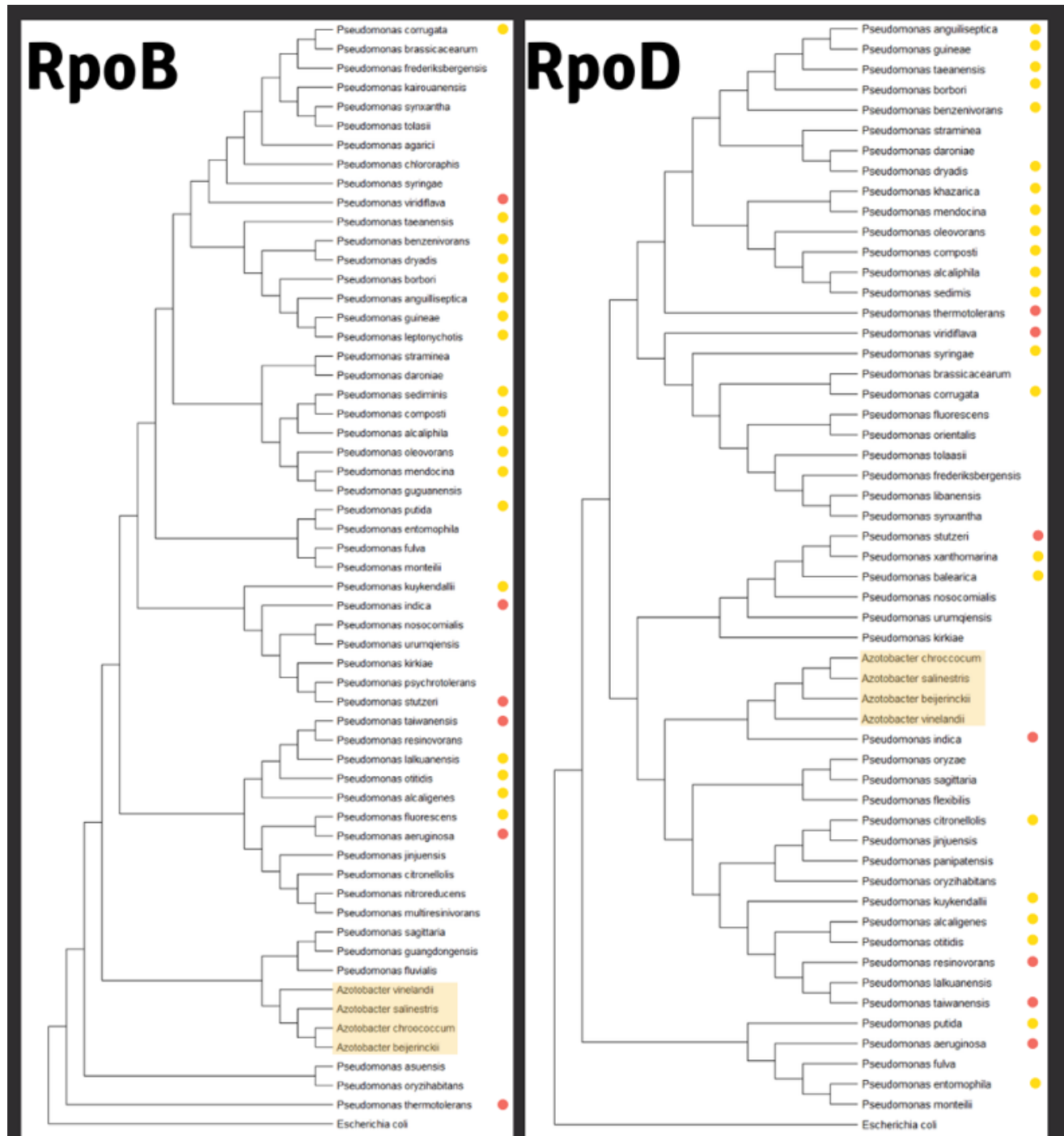


Figura 14: Cladogramas generados a partir de los marcadores RpoB y RpoD. Los puntos representan la presencia de la cinasa LadS1 en cada especie. Se encuentra sombreado el grupo de *Azotobacter*.

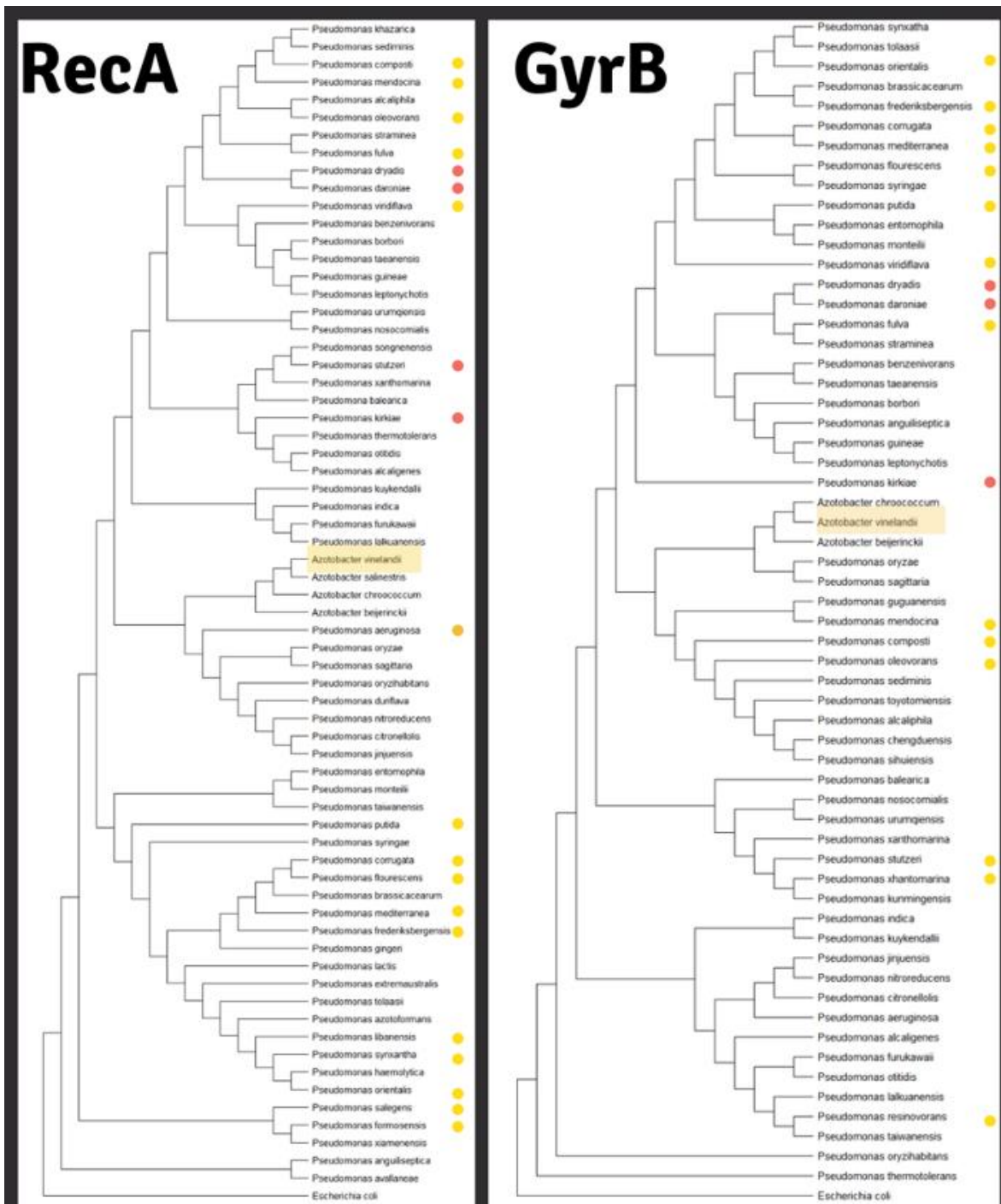


Figura 15: Cladogramas generados a partir de los marcadores RecA y GyrB. Los puntos representan la presencia de la cinasa LadS2 en cada especie. Se encuentra sombreado el grupo de *Azotobacter*.

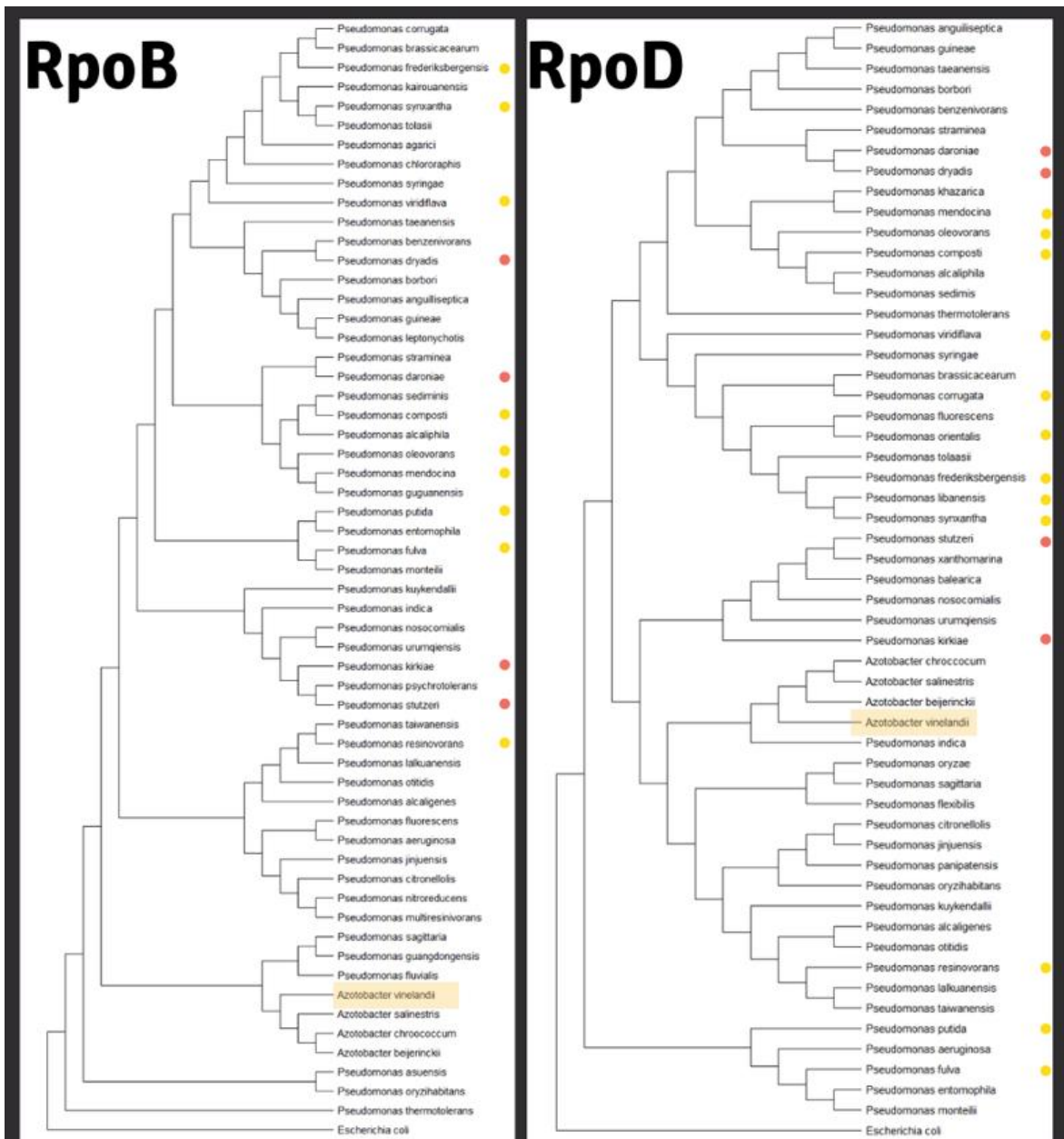


Figura 16: Cladogramas generados a partir de los marcadores RpoB y RpoD. Los puntos representan la presencia de la cinasa LadS2 en cada especie. Se encuentra sombreado el grupo de *Azotobacter*.

Con los cladogramas generados a partir de los marcadores filogenéticos, se pudo comprobar que la distribución de ambas cinasas no es uniforme, además de que no todas las especies cuentan con la presencia de alguna de ellas.

En total fueron analizadas 76 especies de *Pseudomonas* y 4 de *Azotobacter* incluyendo a *A. vinelandii*. En la siguiente tabla se muestra el detalle de la presencia de cada una de las cinasas con porcentaje de identidad y cobertura, es interesante destacar que LadS2 solo se encuentra presente en *A. vinelandii* a comparación de LadS1 que se encuentra en más especies de *Azotobacter*.

<b>Especie</b>	<b>LadS1</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>	<b>LadS2</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>
<i>Azotobacter salinestris</i>		100%	93.3%			
<i>Azotobacter beijerinckii</i>		100%	87.75%			
<i>Azotobacter chroococcum</i>		100%	86.98%			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		97%	56.52%		94%	25.13%
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>		97%	59.08%		91%	25.69%
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>		97%	60.07%		94%	25.23%
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>		98%	59.41%		89%	25.38%
<i>Pseudomonas asplenii</i>					43%	32.58%
<i>Pseudomonas avellanae</i>		66%	37.04%		55%	28.45%
<i>Pseudomonas azotomorfans</i>		94%	30.44%		49%	31.17%
<i>Pseudomonas balearica</i>		99%	51.70%		53%	29.98%
<i>Pseudomonas benzenivorans</i>		99%	60.26%		90%	26.61%
<i>Pseudomonas borbori</i>		97%	59.44%		90%	25.73%
<i>Pseudomonas brassicaceraceum</i>					97%	45.24%
<i>Pseudomonas cedrinae</i>					97%	44.35%
<i>Pseudomonas chengduensis</i>		97%	60.18%		94%	25.23%
<i>Pseudomonas chloritidismutans</i>		97%	53.74%		97%	45.15%
<i>Pseudomonas citronellis</i>		67%	32.97%		97%	42.77%
<i>Pseudomonas composti</i>		98%	59.76%		95%	44.01%
<i>Pseudomonas corrugata</i>		81%	32.05%		97%	46.31%
<i>Pseudomonas daroniae</i>		95%	29.99%		97%	45.24%
<i>Pseudomonas dryadis</i>		97%	58.97%		96%	45.52%
<i>Pseudomonas entomophila</i>		92%	28.28%		56%	31.04%

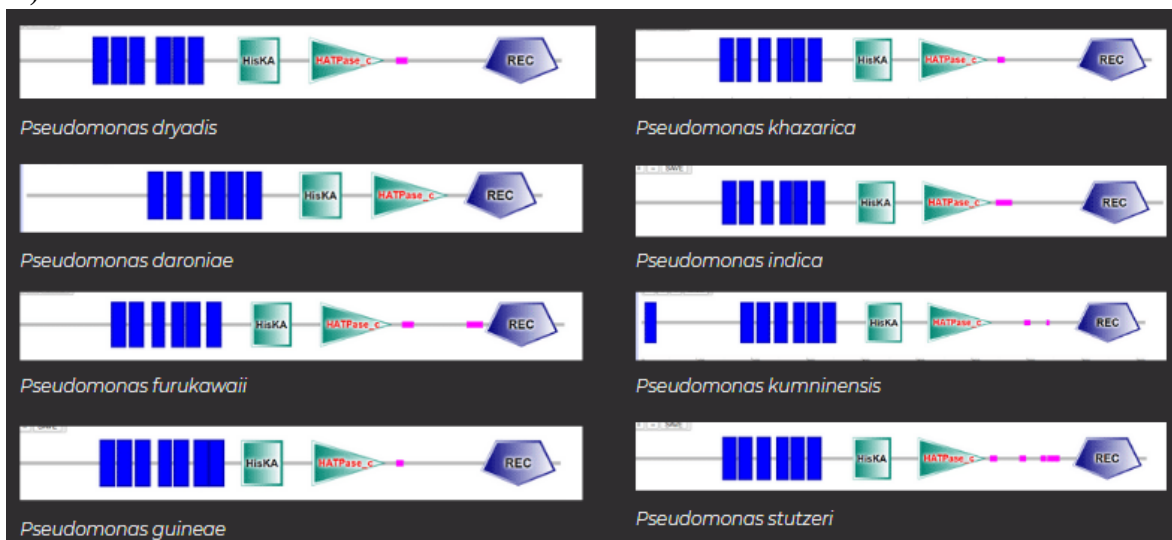
<i>Pseudomonas extremaustralis</i>		98%	29.46%		91%	24.73%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		61%	35.73%		96%	45.44%
<i>Pseudomonas formosensis</i>					98%	51.08%
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>					97%	44.09%
<i>Pseudomonas fulva</i>		65%	33.28%		98%	38.76%
<i>Pseudomonas furukawaii</i>		98%	57.27%		90%	25.17%
<i>Pseudomonas gingeri</i>					45%	31.30%
<i>Pseudomonas grimontii</i>		94%	30.63%		40%	31.69%
<i>Pseudomonas guineae</i>		98%	60.20%		90%	25.10%
<i>Pseudomonas haemolytica</i>					41%	31.52%
<i>Pseudomonas indica</i>		97%	61.16%		90%	25.69%
<i>Pseudomonas khazarica</i>		97%	60.13%		90%	24.39%
<i>Pseudomonas kilonensis</i>					97%	45.56%
<i>Pseudomonas kirkiae</i>		25%	42.86%		96%	54.35%
<i>Pseudomonas kuikendalii</i>		99%	57.05%		96%	43.30%
<i>Pseudomonas kumnignensis</i>		97%	53.58%		48%	30.40%
<i>Pseudomonas leptonychotis</i>		99%	58.73%		90%	25.37%
<i>Pseudomonas libanensis</i>					98%	45.51%
<i>Pseudomonas loprunense</i>		97%	57.73%		53%	30.89%
<i>Pseudomonas lurida</i>					53%	30.32%
<i>Pseudomonas mediterranea</i>					99%	46.03%
<i>Pseudomonas mendocina</i>		96%	60.94%		97%	46.72%
<i>Pseudomonas monteilii</i>					48%	30.85%
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>		81%	33.81%		90%	24.97%
<i>Pseudomonas nosocomialis</i>		97%	51.77%		78%	27.60%
<i>Pseudomonas oleovorans</i>		97%	60.13%		95%	44.40%
<i>Pseudomonas orientalis</i>					98%	45.01%
<i>Pseudomonas otitidis</i>		97%	57.73%		47%	37.85%
<i>Pseudomonas panacis</i>					86%	25.46%
<i>Pseudomonas paralactis</i>		98%	30.02%		86%	25.14%
<i>Pseudomonas pelagia</i>		97%	44.03%		97%	53.29%
<i>Pseudomonas proteolitica</i>					86%	25.67%
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>						



<i>Pseudomonas putida</i>					98%	38.76%
<i>Pseudomonas resinovorans</i>		98%	58.36%		97%	53.29%
<i>Pseudomonas rodhesiae</i>					88%	25.24%
<i>Pseudomonas sagitaria</i>					40%	35.17%
<i>Pseudomonas salegens</i>		70%	32.10%		97%	52.90%
<i>Pseudomonas sedimis</i>		97%	60.29%		90%	25.83%
<i>Pseudomonas sihuiensis</i>		95%	30.48%			
<i>Pseudomonas simiae</i>					91%	24.87%
<i>Pseudomonas sivasensis</i>					41%	31.23%
<i>Pseudomonas songnensis</i>		97%	53.69%		78%	26.91%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		97%	56.10%		96%	40.56%
<i>Pseudomonas synxantha</i>					96%	45.73%
<i>Pseudomonas syringae</i>		60%	34.94%		55%	28.88%
<i>Pseudomonas taeanensis</i>		98%	58.44%		90%	25.57%
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>		98%	57.87%		91%	24.70%
<i>Pseudomonas tarimensis</i>						
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>		97%	57.81%		90%	25.03%
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>					97%	44.40%
<i>Pseudomonas tolaasii</i>		98%	30.02%		86%	25.31%
<i>Pseudomonas toyotomiensis</i>		97%	60.51%		50%	30.75%
<i>Pseudomonas umsongensis</i>					88%	25.27%
<i>Pseudomonas veronii</i>					88%	24.86%
<i>Pseudomonas viridiflava</i>		96%	97.08%		100%	45.07%
<i>Pseudomonas xhantomarina</i>		97%	53.52%		96%	46.61%

Con las secuencias obtenidas de los alineamientos en BLAST, se generaron modelos en la plataforma SMART para corroborar la presencia de los dominios 7TMR DISMs (Figura 17). Se pudo confirmar que estos dominios se encuentran conservados para cada uno de los homólogos putativos de LadS1 y LadS2. También se encontró que LadS2 presenta mayor conservación en *Pseudomonas* mientras que LadS1 en *Azotobacter*.

A)



B)

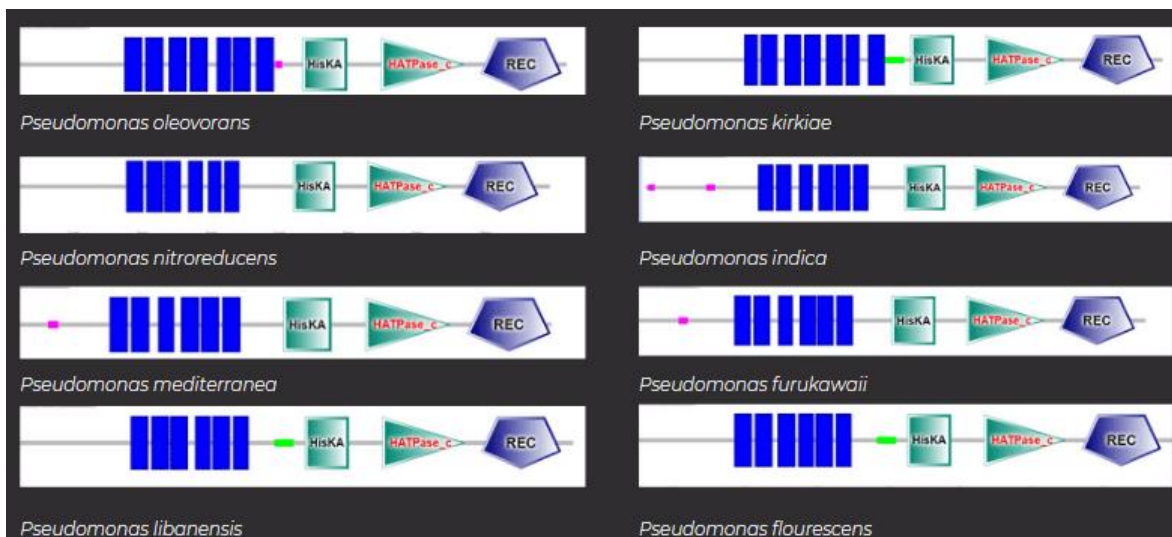


Figura 17: Modelos de las cinasas LadS1 y LadS2 generados en SMART donde se muestra la conservación a nivel estructural de las proteínas A) corresponde a LadS1 y B) a LadS2.



Por último, se realizó un análisis MLSA con cuatro marcadores filogenéticos (RecA, GyrB, RpoD y RpoB) concatenados de las especies más cercanas filogenéticamente para encontrar la distribución de las cinasas LadS1 y LadS2. No se encontró correlación alguna en la distribución de ambas cinasas (Figura 18).

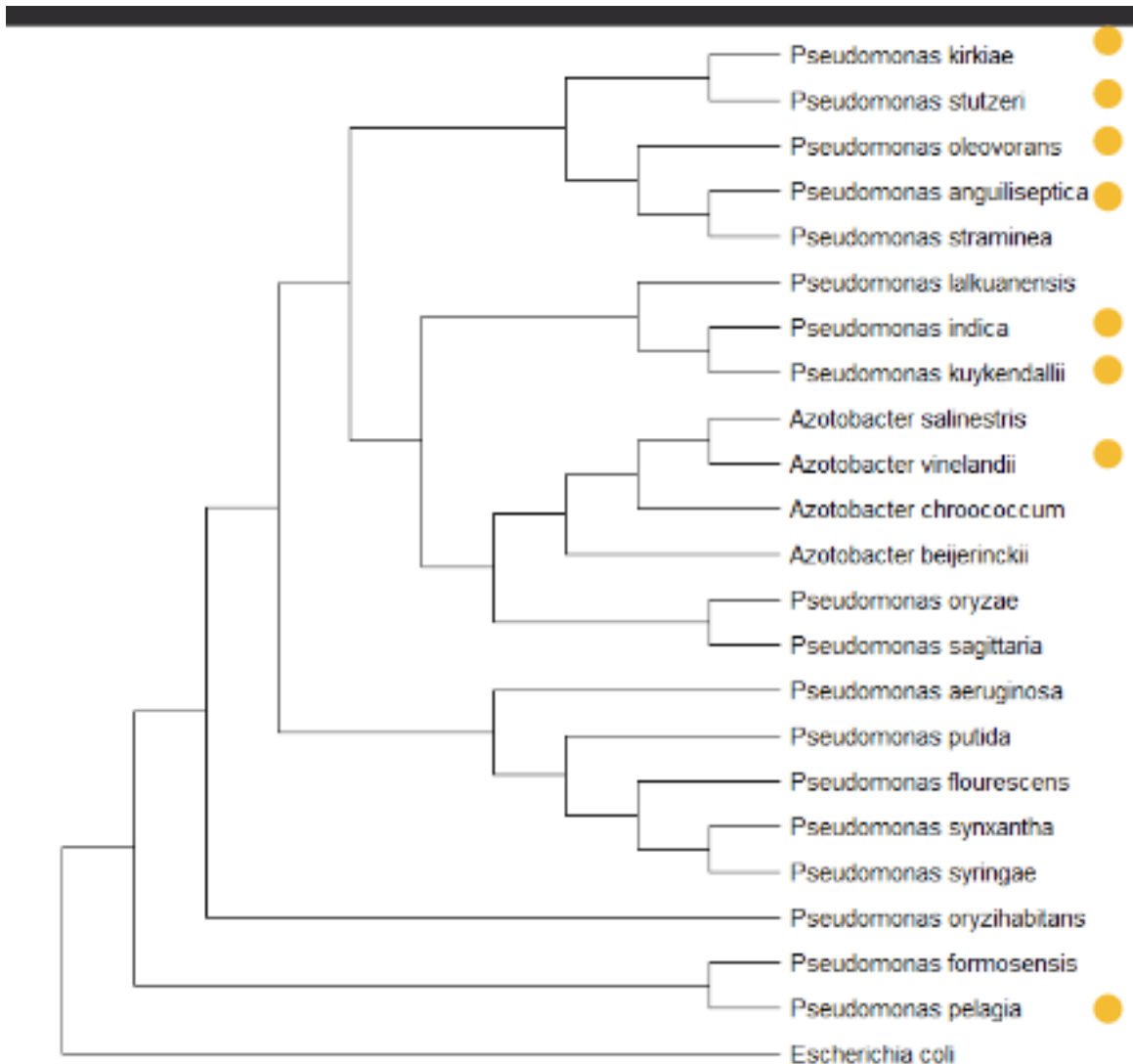


Figura 18: Cladograma generado a partir de los 4 marcadores RecA, GyrB, RpoB, RpoD. El círculo amarillo representa la presencia de ambas cinasas en la especie.

# Análisis de resultados y conclusiones

Con base en los cladogramas realizados, se puede afirmar que LadS1 y LadS2 no se encuentran distribuidos de manera uniforme en las *Pseudomonadaceae*, esto sugiere que la red multicinasas LadS/GacS/GacA no está completamente conservada en esta familia y esta es una característica particular entre distintas especies del grupo. Sin embargo, esto no descarta que existan otras cinasas accesorias que pudiesen interactuar con el SDC GacS/GacA. Resulta particular el hecho de que LadS2 se encuentra más conservada tanto en especies de *Pseudomonas* como en *Azotobacter* a diferencia de LadS1.

En comparación de las HKs ortodoxas, las HKs híbridas tienen características evolutivas especiales, manifestadas en un nivel más alto de polimorfismos de DNA y ratios de evolución más elevados, además de una fusión y fisión genética frecuente (Qian, 2008). Esto explica cómo en este estudio encontramos que la conservación de las cinasas LadS1 y LadS2 se da en un nivel de cobertura con porcentajes desde 55% hasta 99% con conservación de los dominios proteicos característicos de estas cinasas (TMR DISMED), a pesar de que las identidades de las secuencias de aminoácidos no tienen valores mayores al 65%. El patrón filogenético de los dominios 7TMR DISMED no es homogéneo, esto sugiere que existe una historia dinámica entre estos genes que, como en el caso de muchas otras proteínas de señalización, estos genes tienen una herencia de transferencia horizontal entre taxas distantes y pérdida de genes esporádica (Anantharaman, 2003).

Al comparar los distintos cladogramas generados a partir de distintos marcadores, podemos afirmar que la distribución de estas cinasas no corresponde con la filogenia de las *Pseudomonas*, lo cual indica que estas proteínas probablemente no formen parte del núcleo genético conservado entre *Pseudomonas* y *Azotobacter*.

Los análisis filogenéticos realizados en este trabajo permiten corroborar con distintos marcadores filogenéticos que si bien, *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* se agrupan en algunos clados generados, también lo hacen otras *Pseudomonas* de reciente descubrimiento. Esto puede ser debido a que *Pseudomonas* es un género bacteriano complejo y diverso que ocupa gran variedad de nichos en la naturaleza, con un promedio de 10 especies nuevas que han sido descritas por año en la última década (Lalucat, 2020). Seguramente la relación

cercana entre *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* que en el pasado distintos autores reconocían, era debido a que faltaban por caracterizar distintas especies de *Pseudomonas*. La mayor disponibilidad de secuencias y herramientas de análisis filogenéticos comparativos permite mayor resolución al momento de comparar la cercanía de secuencias en distintos grupos bacterianos.

En cualquier escenario es interesante comparar las características biológicas de ambas especies, donde existe una divergencia muy particular. *P. aeruginosa* es una bacteria patógena metabólicamente versátil cosmopolita, mientras que *A. vinelandii* es una bacteria fijadora de nitrógeno que forma vesículas y alginato. Después de conocer la distribución y conservación de las cinasas LadS1 y LadS2 en *Pseudomonas* y *Azotobacter*, es importante mencionar que son necesarios más estudios sobre los sistemas multicomponente y sus cinasas. Probablemente una clasificación funcional y filogénica de las cinasas basada en la arquitectura de los dominios de entrada, herencia evolutiva, contexto genómico y secuencias conservadas puede dar mayor resolución para comprender como distintos grupos bacterianos responden y logran adaptarse al medio ambiente.

# Referencias

- Acocal, V. (2020). Estudio genético funcional de la interacción de las cinasas GacS y LadS en *Azotobacter vinelandii* (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. CICM, Puebla, México.
- Alberts B, *et al.* (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 5ª edición. Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Anantharaman V. and Aravind L. (2003) Analysis of novel families of membrane-associated receptors in bacteria. *BMC Genomics* 4:34
- Bordi, C., Lamy, M.C., Ventre, I., Termine, E., Hachani, A., Fillet, S., Roche, B., Bleves, S., Méjean, V., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2010). Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Mol Microbiol.*76:1427-43.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. 2000. The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182:2624-2628.
- Castañeda, M. et al. (2001). “The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*.” *J Bacteriol.* 183(23):6787-93.
- Chambonnier, G., Roux, L., Redelberger, D., Fadel, F., Filloux, A., Sivaneson, M., de Bentzmann, S., & Bordi, C. (2016). The Hybrid Histidine Kinase LadS Forms a Multicomponent Signal Transduction System with the GacS/GacA Two-Component System in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS genetics*, 12(5)
- Cruz, Y. (2012). Estudio de la influencia de factores ambientales y genéticos en la expresión de *rsmB* en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
- Dubey, B. N., Lori, C., Ozaki, S., Fucile, G., Plaza-Menacho, I., Jenal, U., & Schirmer, T. (2016). Cyclic di-GMP mediates a histidine kinase/phosphatase switch by noncovalent domain crosslinking. *Science advances*, 2(9), e1600823.
- Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4), 1648–1652.
- Espín, G. (2009). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Consultado de Microbios 15 octubre 2021: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>

Francis, V. I., Stevenson, E. C., & Porter, S. L. (2017). Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*, 364(11).

García, D. (2021). Estudio de la cinasa histidínica LadS de *Azotobacter vinelandii* (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. CICM, Puebla, México.

Goodman, A.L. Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R. & Lory, S. (2004). A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*. 7:745–754.

Goodman, A. L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., & Lory, S. (2009). Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes & development*, 23(2), 249–259.

Groisman EA. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. *Annu Rev Microbiol*. 2016 Sep 8;70:103-24.

Hernández-Eligio, A., Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millán LF, Espín G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 158:1953-63.

Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.

Lapouge, K. Schubert, M. Allain, F. H. & Haas D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular Microbiology*. 67, 241–253.

López-Pliego, L., García-Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramírez, L. E., Núñez, C., & Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular biotechnology*, 60(9), 670–680.

Martínez-Carranza, E., Ponce-Soto, G. Y., Servín-González, L., Alcaraz, L. D., & Soberón-Chávez, G. (2019). Evolution of bacteria seen through their essential genes: the case of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (Reading, England)*, 165(9), 976–984.

Ortet P., Fochesato S., Bitbol A., Whitworth D., Lalaouna D., Santaella C. (2021) Evolutionary history expands the range of signaling interactions in hybrid multikinase networks. *Nature: Scientific report* 11, 11763

Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?. *Microbial ecology*, 63(2), 239–248.

Parkins MD, Ceri H, Storey DG. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2001 Jun;40(5):1215-26. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02469.x. PMID: 11401724.

Reyes, N. J. I. (2018). Estudio del efecto regulador de las cinasas RetS y LadS sobre la expresión de los sRNAs de la familia Rsm en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the noncoding RNA molecule CsrB. *Molecular Microbiology.* 29(6):1321–1330.

Romero, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., & Segura, D. (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology,* 195(8), 1834–1844.

Stock, A. M. Robinson V. L, Goudreau P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183–215

Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M. & Romeo, T. (2015) Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 193– 224.

Ventre, e. a. (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 171-176.

Qian, W., Han, Z.-J. & He, C. Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 151–161 (2008).

Zhang, W. & Shi, L. Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: Lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* 151, 2159–2173 (2005).