



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL DOMINIO PAS EN LOS SISTEMAS

DE DOS COMPONENTES DE LA FAMILIA SLC5/STAC

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

INDHIRA ALEJANDRA HERNÁNDEZ LEÓN

DIRECTOR DE TESIS

DR. EDGARDO ALFREDO SEPÚLVEDA SÁNCHEZ HIDALGO

CODIRECTOR DE TESIS

DR. MANUEL ALEJANDRO CARBALLO AMADOR

FEBRERO DE 2023

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS


DETERMINACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL DOMINIO PAS EN LOS SISTEMAS
DE DOS COMPONENTES DE LA FAMILIA SLC5/STAC

TESIS PROFESIONAL

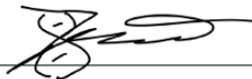
QUE PRESENTA

INDHIRA ALEJANDRA HERNÁNDEZ LEÓN


APROBADO POR:




DR. EDGARDO ALFREDO SEPÚLVEDA SÁNCHEZ HIDALGO
DIRECTOR



DR. MANUEL ALEJANDRO CARBALLO AMADOR
CODIRECTOR



DRA. JIMENA CARRILLO TRIPP
SINODAL



DR. JULIO ENRIQUE VALENCIA SUAREZ
SINODAL

Resumen de la tesis de Indhira Alejandra Hernández León presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México, Mes 2023.

Determinación del funcionamiento del dominio PAS en los sistemas de dos componentes de la familia SLC5/STAC

Resumen aprobado por:



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez

Director de tesis

Resumen

Las bacterias emplean sistemas de dos componentes (SDC) para detectar y responder a señales externas. La familia SLC5/STAC es una nueva familia de sensores de SDC en los que un dominio de señalización y uno de transporte se encuentran en el mismo polipéptido unidos por un dominio único llamado STAC. Estas proteínas poseen otro dominio, llamado PAS, que en otros sistemas de SDC en bacterias ha sido asociado a la captación y el relevo de señales que permiten la autofosforilación del dominio quinasa en la proteína histidina quinasa. Sin embargo, esto no se ha esclarecido en la familia de proteínas SLC5/STAC. Mediante este trabajo se busca identificar la función del dominio PAS en los SDC de esta familia. A partir de una cepa de *Sinorhizobium fredii* que contiene la delección del SDC RpuS/R y CrbS/R, se generó una cepa reportera en la que el gen *uidA* está bajo el control del promotor de piruvato. Para este trabajo se emplearon tres sistemas de dos componentes previamente caracterizados de la familia SLC5/STAC: RpuS/R de *S. fredii* como base, y los dominios PAS de CrbS/R de *Pseudomonas fluorescens* y de *S. fredii*. Debido a que los sistemas son homólogos y presentan cierta similitud de secuencia, se generaron dos proteínas quiméricas en las que el dominio PAS de RpuS/R de *S. fredii* fue sustituido por uno de CrbS/R, así como la generación de una cepa con la delección del dominio PAS. Una de las proteínas quiméricas no fue funcional, mientras que la otra, RpuS/CrbS-SF generó la activación del promotor de piruvato al tener acetato como la principal fuente de carbono, en comparación con WT la actividad fue en menor cantidad (-68%), esto posiblemente debido a que no está optimizado el dominio PAS de CrbS para el sistema RpuS/R. La cepa con la delección del dominio PAS (DEL) no fue funcional en piruvato ni en acetato. Se considera que los resultados obtenidos con DEL y RpuS/CrbS-SF en comparación con la proteína silvestre (WT) brindan apoyo a la hipótesis que postulaba que el dominio PAS funciona en el relevo de señalización en el sistema de dos componentes SLC5/STAC permitiendo la autofosforilación del dominio quinasa al detectar una señal.

Palabras clave: sistemas de dos componentes en procariotas, transducción de señales, dominio PAS, familia de proteínas SLC5/STAC.

Abstract

Bacteria employ two-component systems (TCS) to detect and respond to external signals. The SLC5/STAC family is a new family of TCS sensors in which a signaling domain and a transport domain are found in the same polypeptide linked by a single domain called STAC. These proteins possess another domain, called PAS, which in other TCS systems in bacteria has been associated with the uptake and relay of signals that allow autophosphorylation of the kinase domain in protein histidine kinase. However, this has not been elucidated in the recently discovered SLC5/STAC family of proteins. This work seeks to identify the role of the PAS domain in the TCSs of this family. From a strain of *Sinorhizobium fredii* containing the deletion of the TCS RpuS/R and CrbS/R, a reporter strain was generated in which the *uidA* gene is controlled by the pyruvate promoter. For this work, three two-component systems of the family SLC/STAC previously characterized were used: RpuS/R from *S. fredii* as a base, and the PAS domains of CrbS/R from *Pseudomonas fluorescens* and *S. fredii*. Since the systems are homologous with similar sequences, we generated two chimeric proteins in which the PAS domain of RpuS/R of *S. fredii* was exchanged by one of CrbS/R, as well as the generation of a strain with the deletion of the PAS domain. One of the chimeric proteins was not functional, while the other, RpuS/CrbS-SF, generated the activation of the pyruvate promoter when acetate was the main carbon source, compared to WT the activity was lower (-68%), possibly because the PAS domain of CrbS is not optimized for the RpuS/R system. The strain with the PAS domain deletion (DEL) was not functional in pyruvate or acetate. The results obtained with DEL and RpuS/CrbS-SF compared to wild type (WT) are considered to provide support for the hypothesis that the PAS domain functions in signaling relay in the SLC5/STAC two-component system by allowing autophosphorylation of the kinase domain upon detecting a signal.

Keywords: prokaryotic two-component systems, signal transduction, PAS domain, SLC5/STAC protein family.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco al Dr. Edgardo Sepúlveda, a quien considero una persona excepcional, por haberme bienvenido a su laboratorio en igualdad de condiciones y trato, para realizar mis prácticas profesionales. Por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis después de haber estado en desacuerdo con la primera propuesta, por su paciencia, animo, dedicación y atención como director de tesis. Al Dr. Alejandro Carballo, agradezco su apoyo como codirector y sinodal. También agradezco a mis sinodales, a la Dra. Jimena Carrillo Tripp y el Dr. Julio Suarez por sus valiosas aportaciones a mi tesis.

Quisiera agradecer a mis compañeras de laboratorio, aunque no coincidimos mucho en horarios, ya que siempre sentí que estaba en un ambiente seguro y agradable, yo sabía que podía contar con ellas.

Finalmente, agradezco a mi familia sin quienes evidentemente no existiría, sobre todo a Clementine León por su dedicación, inteligencia y empatía.

Dedicatoria

A las mujeres con discapacidad, quienes existen y resisten, ocupando los espacios que pretende negarles una sociedad que busca su eliminación. Su acompañamiento consciente me nutre de fortaleza y sabiduría, mis logros siempre serán suyos.

A mi tía Larisa León.

Índice

Resumen.....	II
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	IV
Dedicatoria.....	V
Índice.....	VI
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
1. Introducción.....	1
1.1 Sistemas de dos componentes.....	1
1.2 Sistemas de dos componentes en procariotas.....	2
1.3 Sistemas de dos componentes en bacterias.....	3
1.3.1 Sistema de dos componentes FixL/FixJ en <i>Sinorhizobium meliloti</i> y <i>Bradyrhizobium japonicum</i> permite detectar oxígeno.....	3
1.3.2 Desk/DesR detectan cambios en temperatura y regulan la transcripción del gen <i>des</i>	4
1.3.3 Regulación de virulencia en bacterias por sistemas de dos componentes.....	5
1.4 Dominios que conforman a los sistemas de dos componentes.....	8
1.4.1 Histidina quinasa.....	9
1.4.2 Dominios sensores en el citosol.....	9
1.4.3 Dominio de enlace.....	11
1.4.4 Regulador de respuesta.....	11
2. Antecedentes.....	12
2.1 Familia de proteínas SLC5/STAC.....	12

2.1.1 Sistema de dos componentes CbrA-CbrB en <i>Pseudomonas putida</i> de la familia SLC5/STAC.....	14
2.1.2 Sistema de dos componentes CrbS/CrbR en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.1.3 Sistemas de dos componentes de la familia SLC5/STAC en <i>Sinorhizobium fredii</i>	16
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos.....	20
General	20
Específicos	20
6. Metodología.....	21
6.1 Elaboración de la cepa reportera <i>ΔrpuS ΔcrbS prPir::UidA</i>	21
6.4.1 Recuperación del plásmido pVMG::prPir	21
6.4.2 Recuperación de la cepa de <i>S. fredii</i> NGR234 <i>ΔrpuS ΔcrbS</i>	25
6.4.3 Transformación de la cepa de <i>S. fredii</i> NGR234 <i>ΔrpuS ΔcrbS</i> con el plásmido pVMG::prPir.....	25
6.5 Generación de genes deletados y quiméricas.....	26
6.5.1 Extracción de ADN total de <i>Pseudomona fluorescens</i> SBW25	26
6.5.2 Recuperación del plásmido pSRK Gm.....	26
6.5.3 Construcción de pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI.....	27
6.5.4 Delección del dominio PAS de <i>RpuS</i>	28
6.5.5 Generación de genes quiméricos	29
6.6 Expresión de las proteínas quimérica en <i>S. fredii</i> NGR234 <i>ΔrpuS ΔcrbS</i>	30

6.6.1 Digestión de plásmidos con las enzimas de restricción NdeI e HindIII.....	30
6.6.2 Ligaciones de los genes quiméricos de <i>rpuS</i> en el plásmido pSRK Gm.....	31
6.6.3 Transformación de la cepa reportera <i>S. fredii</i> NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ pr <i>Pir::UidA</i>	31
6.7 Ensayos GUS.....	32
7. Resultados.....	35
7.1 Construcción de la cepa reportera	35
7.2 Obtención de genes deletados y quiméricos	37
7.2.1 Verificación de pSRK Gm.....	38
7.2.2 Obtención de pTOPO XL-2:: <i>RpuS/R</i> -EcoRI.....	39
7.2.3 <i>RpuS</i> con la delección del dominio PAS	40
7.2.4 Genes quiméricos obtenidos.....	41
7.3 Obtención de las cuatro cepas diseñadas empleando la cepa reportera y las ligaciones de los genes quiméricos de <i>rpuS</i> en pSRK Gm	44
7.4 Ensayos GUS.....	49
8. Discusión	52
9. Conclusión.....	54
10. Bibliografía.....	55
11. Apéndice I. Mapas de plásmidos utilizados en este trabajo.	64

Lista de figuras

Figura 1. Modelo de un sistema de dos componentes (SDC).....	3
Figura 2. Virulencia mediada por control de genes del sistema de dos componentes BvgA-BvgS en <i>B. pertussis</i>	7
Figura 3. Estructura de los sistemas de dos componentes y de histidinas sensoras.....	8
Figura 4. Familia SLC5/STAC. Dominio STAC.....	13
Figura 5. Modelo del posible funcionamiento de CbrA..	15
Figura 6. Diagrama de la metodología utilizada para obtener una cepa reportera con diferentes construcciones del sistema de dos componentes RpuS/R en <i>Sinorhizobium fredii</i>	24
Figura 7. Electroforesis de las PCRs de los plásmidos pVMG y pVMG::prPir.....	35
Figura 8. Electroforesis de la extracción de ADN total de las colonias seleccionadas de la cepa <i>S. fredii</i> NGR234 Δ rpuS Δ crbS.....	36
Figura 9. Electroforesis del producto de PCR mostrando el fragmento de 436 pb en las seis colonias seleccionadas.....	37
Figura 10. Electroforesis de ADN total obtenido de cuatro colonias de <i>P. fluorescens</i>	38
Figura 11. Electroforesis de la linealización de tres minipreps del plásmido pSRK Gm.....	39
Figura 12. Electroforesis de amplificación de RpuS/R.....	39
Figura 13. Electroforesis de las digestiones de las cuatro minipreps de pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI.....	40
Figura 14. Construcción de quimeras.....	41
Figura 15. Sistemas de dos componentes utilizados.....	42
Figura 16. Electroforesis de las purificaciones.....	43
Figura 17. Electroforesis de las amplificaciones de las dos quimeras.....	44
Figura 18. Construcción de plásmidos pSRK Gm.....	45
Figura 19. Electroforesis de la digestión de DEL.....	46
Figura 20. Comprobación de las construcciones en pSRK Gm mediante una digestión con las enzimas NdeI y HindIII.....	47
Figura 21. Electroforesis de las digestiones de las minipreps de SF mediante una digestión con las enzimas NdeI y HindIII.....	48
Figura 22. Diagrama de las cepas obtenidas.....	48
Figura 23. Gráfica de la actividad relativa para cada una de las cepas empleadas en piruvato y acetato.....	51

Lista de tablas

Tabla I. Organismos y plásmidos empleados en el estudio.	22
Tabla II. Lista de primers utilizados en este trabajo.	23
Tabla III. Resultados del ensayo GUS realizado con piruvato..	49
Tabla IV. Resultados del ensayo GUS realizado con acetato..	50

1. Introducción

1.1 Sistemas de dos componentes

Desde el inicio de la vida hace ~3.5 miles de millones de años (Margulis & Schwartz, 1988), los organismos han desarrollado mecanismos que les permiten percibir a su medio, adaptarse y mantener la homeostasis. Así es como han logrado habitar diversos tipos de ambientes, incluyendo los extremos en la tierra y el mar, e inclusive prescindir de la luz en algunos casos. Un aspecto importante para resaltar es la señalización celular, la cual surge debido a la necesidad de sentir, coordinar y comunicarse con todo lo que es ajeno a sí mismos. La evolución de organismos multicelulares dio lugar a mecanismos con mayor complejidad que permitieron la diferenciación y especialización de células, la formación de tejidos y sistemas. Pese a que los microorganismos son la forma de vida más antigua y abundante, no se han terminado de esclarecer los sistemas de señalización celular básicos de los mismos. Confirmando que, a pesar de parecer sencillos en comparación con las cascadas de señalización de organismos multicelulares complejos, no lo son.

Existe una gran diversidad de sensores y receptores implicados en la señalización celular en las diversas formas de vida, entre ellos se encuentran los sistemas de dos componentes (SDC), que constan de una proteína histidina quinasa sensora (HK) y su regulador de respuesta (RR) (Zschiedrich et al., 2016). Estos sistemas permiten al organismo responder a señales bioquímicas y/o biofísicas externas e internas para lograr adaptarse a un ambiente dinámico mediante la modificación de procesos fisiológicos como la movilidad, osmolaridad, virulencia, resistencia a toxinas/antibióticos y funciones del ciclo celular (Fairweather, 2004). De manera general, una señal ambiental genera un cambio conformacional que a su vez induce la autofosforilación de la histidina quinasa en el residuo histidina (His), generando la transferencia del grupo fosforilo del

fosfo-His a el residuo asparagina (Asp) en el regulador de respuesta, generando la activación del dominio efector río abajo que produce una respuesta específica (Fig.1) (Casino et al., 2010).

Los SDC son abundantes en procariotas, existen en pocos eucariotas (en plantas y hongos) y no se presentan en los animales, debido a lo último existe un interés en su posible aplicación en la generación de terapéuticos antimicrobianos (Gotoh et al., 2010; Tiwari et al., 2017).

1.2 Sistemas de dos componentes en procariotas

Los sistemas de dos componentes son de vital importancia en las bacterias, siendo una de las formas más comunes por las que las bacterias perciben, responden y se adaptan al ambiente. Se han encontrado en la mayoría de los genomas bacterianos secuenciados evidenciando su inmensa utilidad y diversidad (Laub & Goulian, 2007). A través de éstos pueden mediar sus respuestas a los cambios externos, ya sea a nutrientes disponibles, estado de redox celular, cambios en osmolaridad, señales quorum, antibióticos, entre otros (Laub & Goulian, 2007). Se ha encontrado que las bacterias que se encuentran en medios diversos, que presentan cambios rápidos, constan de una mayor cantidad de sistemas de dos componentes mientras que los parásitos intracelulares o endosimbiontes tienen pocos. Debido a esto se puede considerar que los sistemas de dos componentes son un mecanismo de adaptación a las fluctuaciones del medio (Capra & Laub, 2012).

A continuación, se abarcarán tres ejemplos de sistemas de dos componentes en bacterias: el primero está implicado en la detección de oxígeno, el segundo en la transcripción de un gen acorde a cambios en la temperatura y el tercero abarca la regulación de la virulencia mediante sistemas de dos componentes.

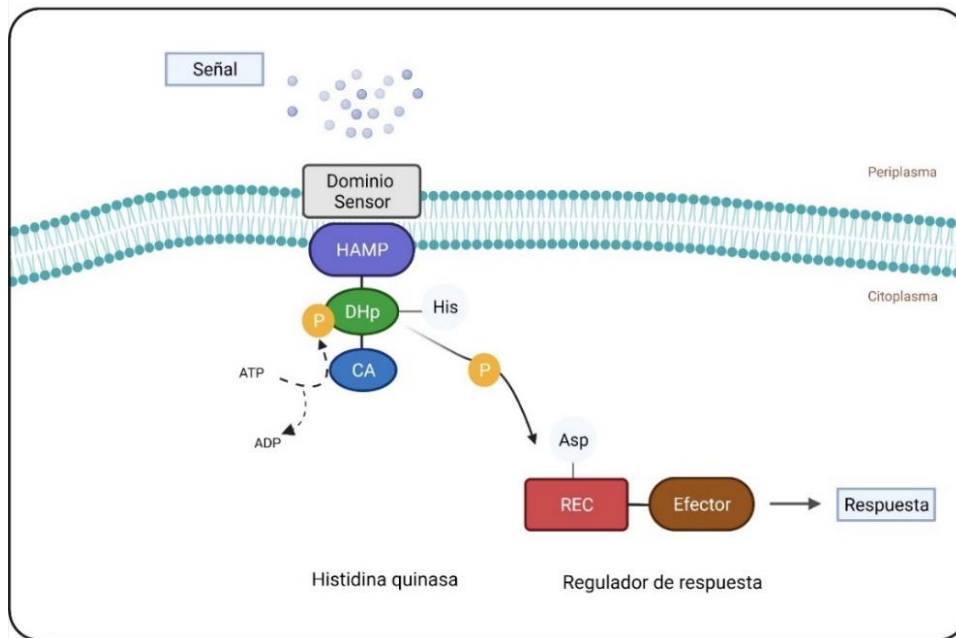


Figura 1. Modelo de un sistema de dos componentes (SDC). La proteína histidina quinasa está conformada por un dominio sensor (Dominio Sensor, DS), junto a un dominio con hélices transmembrana (HAMP) seguido del dominio histidina de dimerización y de transferencia de fosfato (DHp), a su vez adyacente al dominio catalítico y de unión a adenosín trifosfato (ATP) (CA). La proteína reguladora de respuesta está compuesta por el dominio receptor (REC) y un dominio efector variable. La reacción de la autofosforilación requiere de ATP para la fosforilación del residuo histidina conservado del dímero y el dominio de fosforilación de la histidina (DHp). La reacción genera la transferencia del grupo fosforilo (denominado P) del residuo histidina (His) de la histidina quinasa a el residuo conservado asparagina (Asp) del dominio receptor de respuesta (RR), generando una respuesta a la señal inicial que suele ser al nivel de la transcripción de genes.

1.3 Sistemas de dos componentes en bacterias

1.3.1 Sistema de dos componentes FixL/FixJ en *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum* permite detectar oxígeno

Las bacterias aeróbicas gram negativas, *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, pertenecen a la familia Rhizobiaceae y son simbioses de las leguminosas (Kumar et al., 2020). Forman nódulos en las raíces de las fabáceas para la fijación de nitrógeno atmosférico, a cambio las bacterias obtienen carbono por parte de las plantas (Loh & Stacey, 2003). El nitrógeno

es un factor limitante en la naturaleza, se ha estimado que entre el 60-80% del nitrógeno fijado en la naturaleza es atribuible a esta simbiosis (Saranraj et al., 2021). Debido a que múltiples cultivos agrícolas pertenecen a las fabáceas existe un interés por esclarecer el funcionamiento de los mecanismos moleculares que permiten la fijación del nitrógeno (Saranraj et al., 2021; Shamseldin & Velázquez, 2020), así como en su aplicación mediante la generación de biofertilizantes (Maçik et al., 2020).

La expresión de los genes para la fijación de nitrógeno es inducida en *Sinorhizobium meliloti* y en *Bradyrhizobium japonicum* por concentraciones bajas de oxígeno por el sistema de dos componentes FixL y FixJ (Taylor & Zhulin, 1999; Tuckerman et al., 2001). La histidina quinasa FixL de *B. japonicum* consiste en un sensor de oxígeno verdadero, a diferencia de los que dependen de cofactores hemo como el de *S. meliloti*, el sitio de coordinación del hemo es el residuo de histidina 200, que se encuentra en el núcleo el dominio Per-Arnt-Sum (PAS) en la hélice F α (Taylor & Zhulin, 1999; Tuckerman et al., 2001). La disociación del oxígeno por parte del sitio de unión al grupo hemo en el dominio PAS acelera la tasa de autofosforilación del dominio quinasa. El grupo fosforilo es transferido del fosfo-FixL a un residuo aspartato en el regulador de respuesta FixJ, esto genera que FixL actúe como un activador transcripcional de los genes *nifA* que controlan la expresión de los genes de fijación de nitrógeno y el gen *fixK* que controla el complejo de oxidasa de alta afinidad (Taylor & Zhulin, 1999; Tuckerman et al., 2001).

1.3.2 DesK/DesR detectan cambios en temperatura y regulan la transcripción del gen *des*

Bacillus subtilis es un bacteria aerobica Gram-positiva del suelo que se caracteriza por su capacidad de generar esporas (Peng et al., 2021). Presenta adaptabilidad en su metabolismo lo cual

genera que sea fácil y económica de producir. Es empleada en biotecnología para la producción de vitaminas, inositol, asetoína y otras sustancias (Su et al., 2020). También es utilizada como un probiótico que puede aumentar la asimilación de nutrientes así como prevenir la proliferación de bacterias patológicas y de la inflamación intestinal, es una de las bacterias predominantes en la microflora humana normal (Su et al., 2020; Suva et al., 2016). Es utilizado en aplicaciones agrícolas como un promotor de crecimiento y para el control de patógenos (Blake et al., 2021) . En parte, la adaptabilidad de *B. subtilis* es modulada por sistemas de dos componentes que le permiten sensor cambios en la temperatura (Mendoza et al., 2001).

En la bacteria *Bacillus subtilis* se ha caracterizado un sistema de dos componentes responsable de la regulación de la adaptación a temperaturas bajas, conformado por la histidina quinasa sensora DesK y un regulador de respuesta DesR que es responsable de la inducción por frío del gen *des* que codifica para $\Delta 5$ -lípidos desaturasa. El producto de $\Delta 5$ -lípidos desaturasa genera ácidos grasos no saturados y éstos actúan como moléculas de señalización negativa para la transcripción del gen *des*. De tal modo que el sistema de dos componentes, así como la presencia de los ácidos no saturados generados por $\Delta 5$ -lipido desaturasa son el mecanismo que controla la expresión en temperaturas bajas, permitiendo una adaptación del organismo a estos cambios (Mendoza et al., 2001).

1.3.3 Regulación de virulencia en bacterias por sistemas de dos componentes

Las bacterias patógenas se enfrentan a diferentes microambientes durante su proceso de infección al hospedero, requieren de la capacidad de adaptación rápida del medio externo al del huésped; estos procesos suelen ser mediados por sistemas de dos componentes. Pese a que no se ha terminado de esclarecer los principios de la traducción de señales en estos eventos, se ha

avanzado en ello. De manera general, se ha encontrado que las bacterias que habitan ambientes cambiantes suelen presentar una mayor cantidad de SDC. En específico, la prevalencia de los SDC en bacterias que se han adaptado a un nicho dentro del hospedero pareciera ser indicativo de la utilidad de los mismos y de su implicación en la virulencia bacteriana (Beier & Gross, 2006).

Los sistemas de dos componentes pueden funcionar de manera independiente o hay casos, sobre todo en los sistemas de fosforrelevo en los que existe una mayor complejidad ya que pueden haber varias histidinas quininas que interactúen con un solo regulador de respuesta, o una sola histidina quinasa que funcione con múltiples reguladores de respuesta (West & Stock, 2001). Se ha descrito que en la regulación de la virulencia pueden estar implicadas redes complejas de por lo menos cuatro sistemas de dos componentes y reguladores adicionales como sucede en la especie *Staphylococcus aureus* (Novick, 2003), que aunque es un comensal común en la microbiota humana puede causar también infecciones importantes. En contraste, hay situaciones en los que un solo sistema de dos componentes (BvgA-BvgS), en este caso perteneciente a la familia de fosforrelevo, regula en gran medida la virulencia como sucede en la proteobacteria causante de la tos ferina, *Bordetella pertussis*. En la histidina censora BvgS ocurre un fosforrelevo de His-Asp-His del grupo fosforilo antes de la transfosforilación del regulador de respuesta BvgA (Beier & Gross, 2006). La histidina quinasa contiene un dominio PAS, pero se desconoce su función. Este sistema de dos componentes promueve la expresión de genes de virulencia a la temperatura corporal del hospedero (~37°C) y en la ausencia de algunos compuestos como iones de sulfato y ácido nicotínico. Lo anterior se desactiva ante un aumento de los compuestos moduladores o al bajar la temperatura. Se ha encontrado que el estado de redox de los electrones de transporte quinona pueden afectar al sistema BvgS, por lo que señales intracelulares podrían tener una

implicación en el control de los factores. Los factores pueden ser clasificados en cuatro categorías dependiendo de su patrón de expresión y su cinética de inducción transcripcional, cada clase tiene una implicación en diferentes partes del ciclo de infección/virulencia con la excepción de la clase cuatro que no se ha identificado su mecanismo de función pero que está implicado en la represión de la virulencia (Fig.2)(Beier & Gross, 2006).

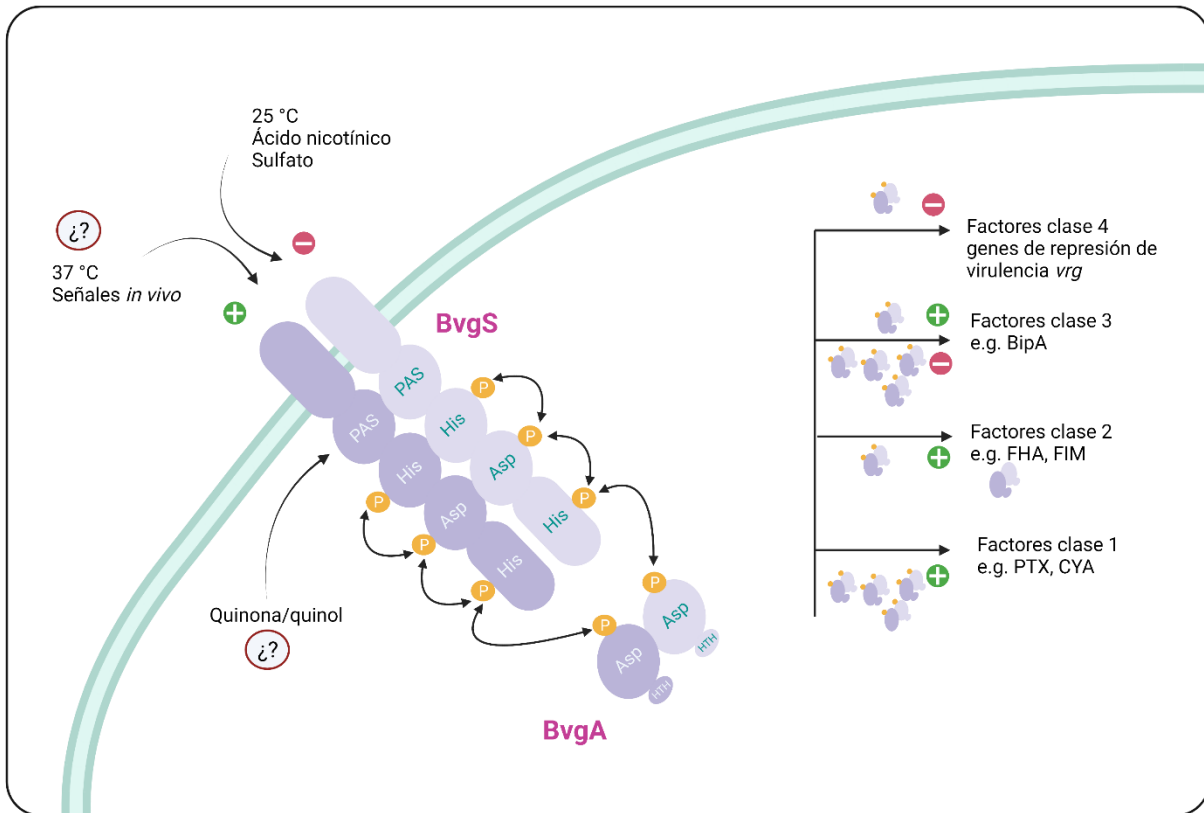


Figura 2. Virulencia mediada por control de genes del sistema de dos componentes BvgA-BvgS en *B. pertussis*. BvgS y BvgA son homodímeros. La fosforilación del homodímero quinasa sensora BvgS probablemente sucede en trans en los dominios de los diferentes monómeros. A mano derecha se aprecia el impacto de diferentes concentraciones de homodímeros (BvgA~P) en la expresión de diferentes clases de genes. ‘+’ indica activación y ‘-’ represión de la expresión del factor. Cabe notar que ambos BvgA-BvgS activan o reprimen los factores de clase 3, dependiendo de la concentración, cuando es alta lo reprime mientras que cuando es baja lo activa. Adaptado de Beier & Gross, 2006.

1.4 Dominios que conforman a los sistemas de dos componentes

Debido a la abundancia de los sistemas de dos componentes, existe una amplia diversidad en los dominios de entrada de señales y en las respuestas celulares que generan, por ello presentan variedad en los dominios de entrada y salida. Por otro lado, las estructuras catalíticas y los dominios de regulación de las dos proteínas están conservados en gran medida (Fig. 3) (Jacob-Dubuisson et al., 2018). Sin embargo, estudios recientes han demostrado diversidad en los mecanismos moleculares por los que estas proteínas se fosforilan y comunican (Zschiedrich et al., 2016).

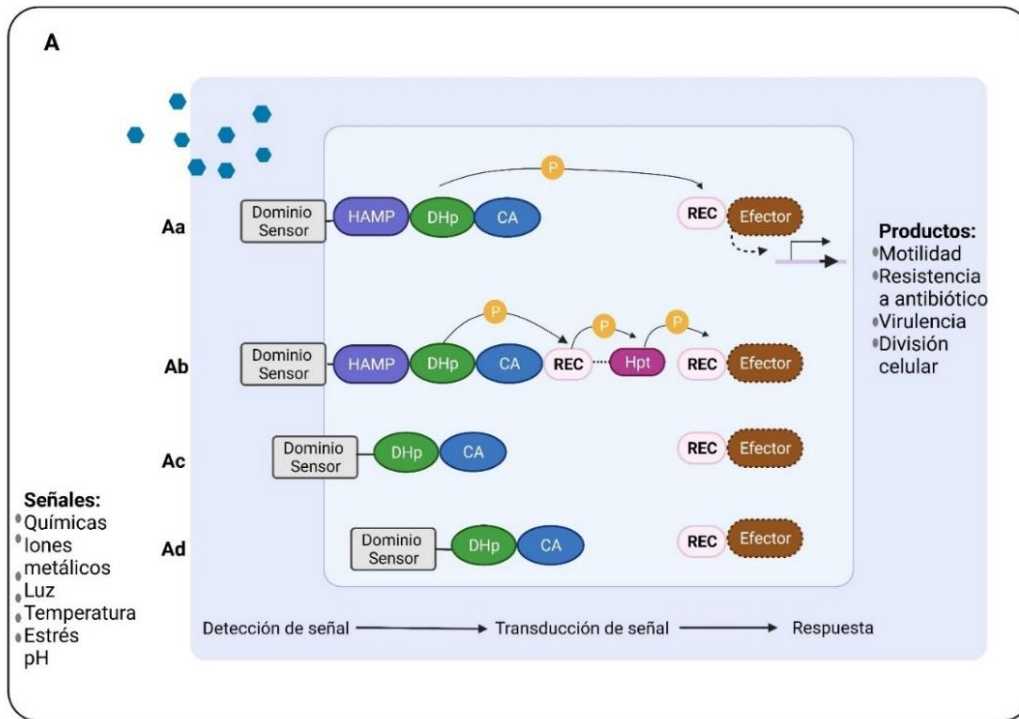


Figura 3. Estructura de los sistemas de dos componentes y de histidinas sensoras. A) Esquema de los dominios y mecanismos de señalización de los sistemas de dos componentes (SDC). El prototipo de SDC (Aa) y de fosforrelevo (Ab), así como las histidinas quinasas (HK) con sensores intramembranales (Ac) y citoplásmicos (Ad). Se indica la transferencia de los grupos fosforilo con flechas, la línea punteada entre el dominio receptor (REC) y el dominio de la histidina de fosfotransferencia (Hpt) indica que fosforrelevo, el dominio receptor (REC) puede ser parte de la histidina

quinasa sensora o una proteína separada. El dominio efector está punteado debido a que a veces no se presenta en el regulador de respuesta (RR). HAMP= dominio de enlace, DHp= representa la dimerización y el dominio de fosfotransferencia de histidina, CA= dominio catalítico. Adaptado de Jacob-Dubuisson et al., 2018.

1.4.1 Histidina quinasa

La superfamilia histidina quinasa tiene una arquitectura modular con una amplia diversidad de dominios de entrada enlazados a un núcleo catalítico conservado. Este diseño permite la captación de una gran diversidad de señales de entrada y la realización de la respuesta de salida adecuada mediante una vía de autofosforilación y fosfotransferencia conservada (Papon & Stock, 2019). El estímulo ambiental es detectado de manera directa o indirecta por el amino (N)-terminal del dominio sensor de la histidina quinasa, aunque no se ha terminado de esclarecer el mecanismo (Ishii & Eguchi, 2021; Jacob-Dubuisson et al., 2018).

En el prototipo de histidina quinasa, el núcleo citoplásmico consiste de dos dominios: un dominio conservado carboxilo (C)-terminal catalítico y uno de unión a ATP (CA) el cual es responsable de la transferencia del grupo fosforilo del ATP a el residuo histidina, y un dominio menos conservado de dimerización y fosfotransferencia (DHp) (Gao & Stock, 2009).

Las histidinas quinasas ortodoxas contienen un solo dominio histidina en el que sucede la autofosforilación mientras que las no ortodoxas (poco usuales) tiene dos dominios histidina y un dominio de aspartato. Debido a esto los no ortodoxos tienden a tener mecanismos de fosforrelevo con mayor complejidad que los ortodoxos (Kim & Cho, 2007).

1.4.2 Dominios sensores en el citosol

El dominio PAS es una familia de dominios sensores en proteínas. Estos consisten de ~100 amino ácidos y suelen estar adyacentes a la última región transmembrana del dominio sensor y en

el extremo N-terminal del dominio quinasa (Stock et al., 2000). Su estructura consiste en un pliegue α/β , resaltando poca conservación a nivel de secuencia. Estos dominios comparten estructuras y flexibilidad lo cual pudiese indicar un mecanismo de comunicación de unión/activación a un transductor río abajo de proteínas (Vreede et al., 2003).

El dominio PAS se encuentra en proteínas en todos los reinos de la vida, forma clados estructurales con base en dos variables: la ubicación dentro o fuera de la membrana y la clase de moléculas pequeñas a las que se puede unir (Gu et al., 2000). Están presentes en ~40% de las histidinas quinasa sensoras, funcionan como un módulo de transferencia de señales en las histidinas quinasa asociadas a la membrana o como sensores en histidinas quinasa solubles. La posibilidad de unión con metabolitos pequeños es característico de la familia de dominios PAS (Xie et al., 2010). La unión a ligandos funciona como una señal que permite el inicio de la señalización celular de respuesta o puede posibilitar que el dominio pueda responder a señales físicas o químicas como moléculas de gas, potencial redox o fotones (Henry & Crosson, 2011; Stuffle et al., 2021). A la fecha no se han terminado de esclarecer los mecanismos de su respuesta a la percepción de señales, es posible que en los dominios PAS de relevo las señales de entrada generen una reorganización de la interface inter-promotora, de la interfaz con los dominios de enlace que le flanquean o con otros dominios (Jacob-Dubuisson et al., 2018).

Otra familia de dominios de unión a moléculas pequeñas en el citoplasma es GAF, nombrada por algunas de las proteínas en las que se encuentra, como: fosfodiesterasas específicas de cGMP, adenilil ciclasas y FhlA (Aravind & Ponting, 1997); está presente en ~9% de las histidinas quinasa. GAF y PAS tienen una variabilidad alta en sus secuencias y presentan plasticidad estructural por lo que pueden reconocer no solo estímulos sino que también

transducción de señales, debido a ello suelen tener interacciones proteína-proteína (Gao & Stock, 2009).

1.4.3 Dominio de enlace

En las histidinas quinasa transmembranales el dominio sensor se encuentra unido al núcleo citoplásmico de la quinasa mediante una hélice transmembranal y un dominio de enlace citoplásmico, no se ha esclarecido su función pero se ha encontrado que es requerido para la transducción de señales (Stock et al., 2000). Un ejemplo es el dominio HAMP, éste se encuentra de manera común en los receptores dímeros transmembranales en procariotas, enlaza sensores extracelulares con dominios internos de señalización en una gran variedad de proteínas, entre ellas las histidinas quinasa, adenilil ciclasas, receptores de quimiotaxis y fosfatasa; se encuentra en el C-terminal del último segmento transmembrana (Hulko et al., 2006). Sus secuencias constan de la repetición de un patrón de siete residuos. Se ha aceptado el que el dominio HAMP consiste en dos hélices anfipáticas con propiedades de hélices superenrolladas (coiled coil). Se considera que funcionan de dos maneras: mecánico, en el relevo de cambios conformacionales entre dos dominios (señalización cis) e interactivo, al unirse de manera específica a un dominio efector (señalización trans) (Ferris et al., 2011).

1.4.4 Regulador de respuesta

El regulador de respuesta consta de un dominio regulador conservado o receptor (REC). El prototipo está conformado por el dominio receptor con su N-terminal unida a un dominio efector que puede variar. El dominio receptor toma parte en la catálisis de la transferencia del grupo fosforilo de la histidina quinasa a sí mismo y regula la actividad del dominio efector, esto último depende de la fosforilación (Buschiazzo & Trajtenberg, 2019; R. Gao et al., 2019). El efector

genera una respuesta de salida, debido a que existe una gran diversidad de dominios efectores, es posible realizar una gran cantidad de respuestas peculiares que a su vez son reguladas por el sistema de dos componentes. El ~17% de los reguladores de respuesta se encuentran con un solo dominio REC. Los reguladores de respuesta tienen dos conformaciones dominantes, la activada y la inactivada. Mediante la inhibición o activación particulares de cada regulador de respuesta, el dominio receptor controla las actividades del dominio efector. El dominio receptor tiene actividad enzimática, cataliza la transferencia del grupo fosforilo y su autodesfosforilación (Gao & Stock, 2009). La mayoría de los reguladores de respuesta son reguladores transcripcionales, sus dominios efectores son dominios de unión de ADN. Algunos de los dominios efectores de los reguladores de respuesta son enzimas, otros se unen a ARN, ligandos o proteínas para regular procesos celulares de la bacteria a nivel postranscripcional o postraduccional. Los dominios receptores tienen estructuras y secuencias conservadas, sobre todo los que se encuentran en la C-terminal, posiblemente permitiendo la continua señalización con los dominios conservados de la histidina quinasa implicados en la transferencia del grupo fosforilo (Wang, 2016).

2. Antecedentes

2.1 Familia de proteínas SLC5/STAC

En los últimos años se ha descubierto que el dominio STAC, el cual está asociado a un dominio simportador de soluto SLC5, es parte de los sistemas de dos componentes. Debido a lo anterior se le nombró STAC (SLC5 y TCST-Associated Component). Las proteínas de esta familia constan de un sensor en el que los dominios de señalización y transporte se encuentran en el mismo polipéptido. El dominio STAC contiene 68 residuos, forma cuatro hélices con sus terminales N- y C- a corta distancia. En solución es monomérico, consta de dos horquillas α conectados por un

bucle central que suele ser de nueve residuos, se puede encontrar como una proteína independiente o como parte de una proteína multidominio (Korycinski et al., 2015). Cuando se encuentra unida a otros dominios, esto suele ser a partir de su N-terminal a un simportador de sodio-soluto de la familia 5 (SLC5) y en su C-terminal con una variedad de dominios propios de los sistemas de señalización, como las histidinas quinastas (Fig. 4). Las proteínas SLC5 son simportadores que transportan diversos solutos a través de la membrana asociados a Na⁺, cuando se encuentran asociadas al dominio STAC constan de 13 hélices transmembrana con una orientación antiparalela que forma un canal de transporte. Las proteínas que contienen un dominio STAC son abundantes en las bacterias, pero están ausentes en Archaea y Eucariotas. Se desconoce la función del dominio STAC, se considera que es probable que sea estructural (Korycinski et al., 2015).

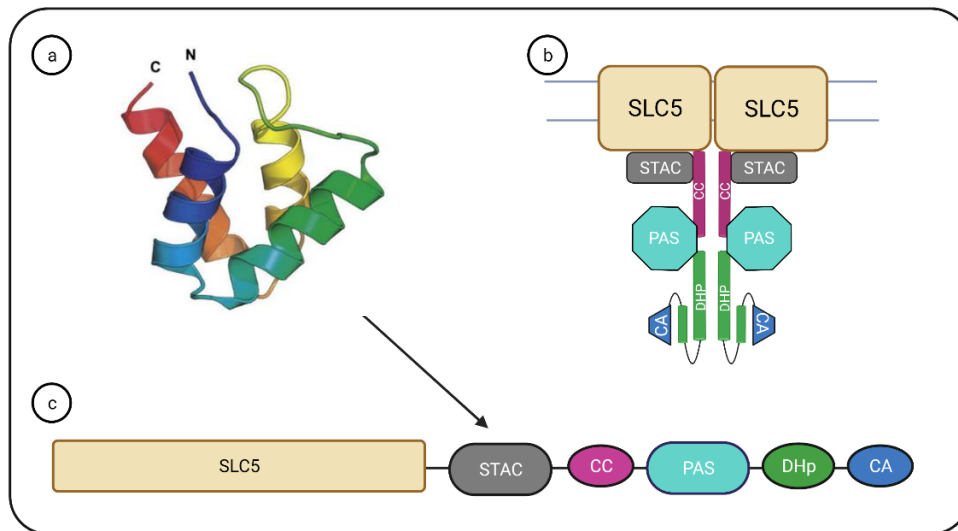


Figura 4. Familia SLC5/STAC. Dominio STAC (a), histidina quinasa con posicionamiento hipotético del dominio STAC (b), dominios de la proteína histidina quinasa (c). Modificada de Korycinski et al., 2015.

Debido a que la familia de proteínas SLC5/STAC se identificó recientemente, se han caracterizado pocos sistemas. Inicialmente se realizaron caracterizaciones en

Gammaproteobacterias como *Pseudomonas* (Sepulveda & Lupas, 2017; Wirtz et al., 2020), recientemente se han caracterizado dos sistemas en la Alphaproteobacteria *Sinorhizobium fredii* (Ramos et al., 2022). Pese a las caracterizaciones de algunos sistemas, no se ha esclarecido la función del dominio STAC ni del dominio PAS.

2.1.1 Sistema de dos componentes CbrA-CbrB en *Pseudomonas putida* de la familia SLC5/STAC

El sistema de dos componentes CbrA/B está implicado en la regulación del balance celular de carbono/nitrógeno y tiene un rol importante en la represión de catabolitos de carbono. Se ha demostrado que CbrA puede unirse y transportar histidina (Nishijyo et al., 2001; Valentini et al., 2014). El dominio quinasa no es requerido por el dominio SLC5 para la captación de histidina. La histidina quinasa puede autofosforilarse y transferir el grupo fosforilo al regulador de respuesta sin la presencia del dominio SLC5, pese a que SLC5 no es esencial parece tener una actividad en la modulación de la autoquinasa. CbrA funciona como un transportador de histidina y una quinasa sensora. Se considera posible que el dominio PAS pueda detectar un metabolito intracelular indicando la detección del sustrato en el medio externo y así generar una señal al dominio quinasa (Fig. 5) (Wirtz et al., 2020).

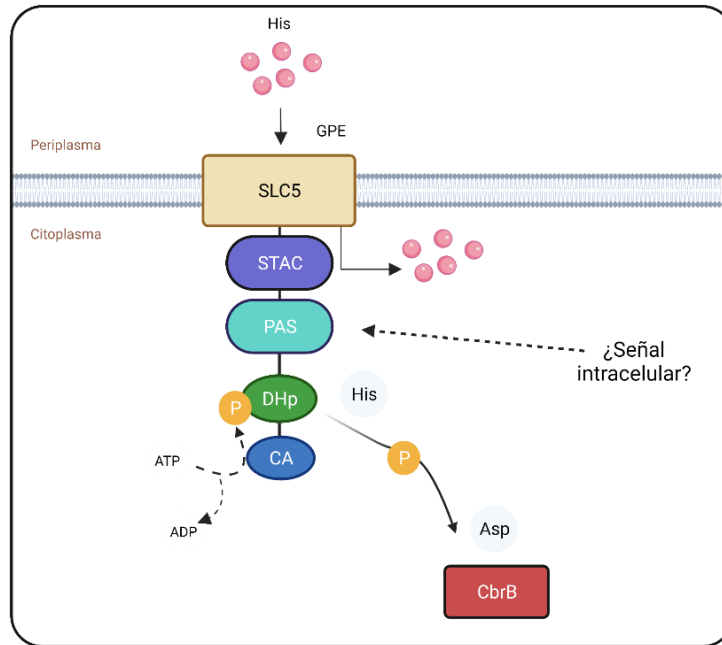


Figura 5. Modelo del posible funcionamiento de CbrA. El dominio SLC5 transporta histidina al citoplasma mediante un gradiente de protones electroquímico. El dominio DHp se autofosforila utilizando ATP en His766, transfiriendo el grupo fosforilo a Asp52 del regulador de respuesta CbrB. Se considera posible que un metabolito intracelular sea percibido como una señal por el dominio PAS. GPE, gradiente de protones electromagnético. Modificado de Wirtz et al., 2020.

2.1.2 Sistema de dos componentes CrbS/CrbR en *Pseudomonas fluorescens*

El sistema CrbS/R es un sistema de señalización de dos componentes que regula la utilización del acetato en *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa*, *P. entomophila* y *P. fluorescens*. Es una histidina quinasa que pertenece a la familia SLC5/STAC. Cuando CrbS es activada, CrbR activa la transcripción del gen *acs*, el cual codifica para acetil Co-A sintasa, regula los genes: *pflu1318*, *actP*, y *pflu5625* y *pflu0110*; interesantemente este último fue el único que al realizarse una deleción disminuyó la capacidad de *P. fluorescens* de crecer en acetato (Sepulveda & Lupas, 2017). Debido a que las condiciones experimentales difieren a las de las condiciones naturales, es posible que los otros genes pudiesen estar implicados en la detección y uso de acetato en

concentraciones más bajas de nutrientes. Se identificó un motivo proteínico conservado en la región del promotor de los genes para el uso de acetato que es requerido para la activación del promotor de CrbR, el cual fue nombrado motivo ACTU (Sepulveda & Lupas, 2017).

Debido a que en *P. fluorescens* existe otro sistema de dos componentes, el CbrA/B, se realizaron quimeras que permitieron apreciar que el dominio de la histidina quinasa no depende del dominio SLC5 para poder activar a CrbB. Lo anterior se puede deber a que los nutrientes se encuentran en niveles bajos en el medio natural y la fusión de SLC5 a la histidina quinasa, en los SDC que contienen un dominio STAC, puede facilitar una detección temprana y una respuesta rápida en ambientes competitivos (Sepulveda & Lupas, 2017).

2.1.3 Sistemas de dos componentes de la familia SLC5/STAC en *Sinorhizobium fredii*

Recientemente se han caracterizado dos sistemas de dos componentes de la familia SLC5/STAC en *S. fredii*. Uno es un homólogo del sistema CrbS/R que es requerido para el crecimiento en acetato, así como sucede en las Gammaproteobacterias *Vibrio* y *Pseudomonas* (Muzhingi et al., 2018; Sepulveda & Lupas, 2017; Wirtz et al., 2020). El otro, que fue nombrado RpuS/R, está implicado en el crecimiento óptimo en piruvato (Ramos et al., 2022). Este sistema regula la expresión de un operón que codifica para el simportador de piruvato MctP cuando el piruvato es la única fuente de carbono disponible para *S. fredii*. Se encontró un motivo de ADN conservado en la región del promotor de piruvato del operón de MctP que es requerido para la activación transcripcional por parte de Rpu/R (el regulador de respuesta) en condiciones de utilización de piruvato. En Rhizobia, la regulación del uso de piruvato a través de las enzimas piruvato carboxilasa y piruvato deshidrogenasa es compleja e implica mecanismos transcripcionales y post transcripcionales; por ello el adquirir un sistema modular le permite

obtener de manera eficiente el sustrato brindándole una ventaja competitiva sobre otros microorganismos. La adaptación de los sensores de sistemas de dos componentes, en particular los de los de la familia SLC5/STAC, como reguladores de genes que permiten una detección temprana en condiciones de baja cantidad de sustrato favorece la sobrevivencia (Ramos et al., 2022).

3. Justificación

Debido a que se ha visto que el dominio SLC5 y el dominio STAC no son requeridos para la activación de la histidina quinasa y la transcripción de genes (Casino et al., 2010; Ramos et al., 2022; Sepulveda & Lupas, 2017), se precisan más estudios para lograr esclarecer el mecanismo que permite a los sistemas de dos componentes, como el RpuS/R y CrbS/R en *Sinorhizobium fredii*, detectar a los sustratos. De manera general se reconoce la implicación del dominio PAS en la señalización en algunos sistemas de dos componentes (Borland et al., 2016; Monteagudo-Cascales et al., 2019; Wirtz et al., 2020). Se ha sugerido que en el sistema de dos componentes CbrA/B en *Pseudomonas putida* el dominio PAS pudiese reconocer a un metabolito intracelular aun no identificado que pudiese percibir e iniciar la señalización en la histidina quinasa ya que la histidina parece no estar implicada (Monteagudo-Cascales et al., 2019).

Con base a lo antes mencionado y el uso previo de proteínas quiméricas para la caracterización de los sistemas de dos componentes (Sepulveda & Lupas, 2017), mediante la realización de proteínas quiméricas se buscará esclarecer la función del dominio PAS en el sistema de dos componentes RpuS/R que detecta piruvato en *Sinorhizobium fredii* ya que es posible que esté implicado en la detección y señalización de los sustratos. Debido a que han sido caracterizados tres sistemas de dos componentes, dos en *S. fredii* (RpuS/R y CrbS/R) y uno en *Pseudomonas fluorescens* (CrbS/R), que son homólogos y comparten cierta similitud de secuencia, será posible la construcción quimeras, intercambiando diferentes dominios, para el esclarecimiento de la función del dominio PAS en la percepción de sustratos.

4. Hipótesis

El dominio PAS funciona en el relevo de señalización en el sistema de dos componentes SLC5/STAC permitiendo la autofosforilación del dominio quinasa al detectar una señal.

5. Objetivos

General

Identificar la función del dominio PAS en los sistemas de dos componentes.

Específicos

- 1.** Construir una cepa en la que la proteína RpuS carezca del dominio PAS.
- 2.** Construir proteínas quiméricas en las que el dominio PAS de RpuS será sustituido por el dominio PAS de otras proteínas de la familia SLC5/STAC.
- 3.** Caracterizar funcionalmente la proteína RpuS que carece del dominio PAS y las proteínas quiméricas.

6. Metodología

6.1 Elaboración de la cepa reportera *ArpuS ΔcrbS prPir::UidA*

6.4.1 Recuperación del plásmido pVMG::prPir

Se recuperó el plásmido pVMG::prPir (Tabla I, Fig. 6 y Apéndice I) y el plásmido sin inserto como referencia a partir de resguardos en glicerol en *E.coli*, para esto se realizó un cultivo en medio sólido Luria Bertani LB (para un litro: extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 5 g, peptona 10 g y agar 15 g) con kanamicina 50 µg/mL (Km) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Se realizó la extracción del plásmido mediante minipreps acorde a las indicaciones del kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic. A continuación, se hicieron digestiones de las minipreps con las enzimas de restricción BamHI y Sall (1 µL (1U) de cada enzima, 2 µL de buffer verde FastDigest ~10 µL (1µg) de ADN y 6 µL de H₂O), se incubaron durante 15min. a 37°C. Después se confirmó la presencia del plásmido mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis (sistema de mini-electroforesis, modelo MINI-ES) con buffer TAE 1X durante 20 min a 100 V. Se visualizó el gel por medio de un transiluminador LED (Midi blue LED transilluminator de IO Rodeo) con el colorante SYBRsafe (Thermofisher). Con el propósito de volver a confirmar la obtención del plásmido pVMG::prPir, se realizó una PCR con los primers c01850Al y c01850Bu (temperatura de 68° y tiempo de extensión de 10 s) (Tabla II). Las reacciones fueron de 50 µL, cantidades empleadas: polimerasa Phusion High Fidelity 0.5 µL (0.02 U/µL), 5X Buffer High Fidelity 10 µL (1X), dNTPs 1 µL (200µM), DMSO 1.5 µL (3%), H₂O 32 µL y 2.5 µL (0.5 µM) de cada primer.

Tabla I. Organismos y plásmidos empleados en el estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Pseudomona fluorescens</i> SBW25	Cepa parental	(Silby et al., 2009)
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR 234	Cepa parental Nal ^r Rif ^r	(Stanley et al., 1988)
NGRΔDb1	Δ <i>crbS</i> Δ <i>rpuS</i> Nal ^r Rif ^r	(Ramos et al., 2022)
NGRC30	Δ <i>rpuS</i> Δ <i>crbS</i> pr <i>Pir</i> :: <i>Uida</i>	Este trabajo
Plásmido	Genotipo	Referencia
pVMG	Plásmido para la integración transcripcional del gen <i>uidA</i>	(M. Gao et al., 2019)
pSRKgm	Vector de expresión de huésped amplio Gm ^r	(Khan et al., 2008)
pVMG PrmctP	Fusión transcripcional integrativa del promotor del operon <i>MctP</i> Km ^r	(Ramos et al., 2022)
pCR-XL-2-TOPO	Vector de clonación	Invitrogen
pCR-QSF	pCR-XL-2-TOPO con PAS <i>CrbS</i> -SF/RpuS	Este trabajo
pCR-QPF	pCR-XL-2-TOPO con PAS <i>CrbS</i> -PF/RpuS	Este trabajo
p-CR-DEL	pCR-XL-2-TOPO con RpuSΔPAS	Este trabajo
p-CR-WT	pCR-XL-2-TOPO con RpuS/R	Este trabajo

Tabla II. Lista de primers utilizados en este trabajo.

Primers	Secuencia	Tm (°C)
b22750HindIII	TTGTACTAAGCTTCTATCCCGCATCGCGG	64
c01850A1	AAATTCGCGTCCCGGCCCTCACTCCTCGACGGTGAG	73
c01850Bu	GTCGAGGAGTGAGGCCGGACGCGGAATTTGCC	72
c22760HindR	gattcaagctTGATCATCCGCGATGACGAT	62
c22760NdeF	gattccatATGCCCGGTTGGGTCGT	63
DelPasRpuSF2.0	GGGCTGCGCCGCGCCAAT	66
DelPasRpuSR2.0	CAGGAGCTTGCGGTTGAAATGCAG	61
PASflQuF2.0	ATTTCAACCGCAAGCTCCTGCAAGGCGCCATCGAAAACAT	71
PASflQuR2.0	TCATTGGCGCGGCGCAGCCCCTGTTTCGGCTTCGCGGAACG	79
PASfrQuF2.0	ATTTCAACCGCAAGCTCCTGCAGACGGCGCTCTCGCAGATGG	74
PASfrQuR2.0	TCATTGGCGCGGCGCAGCCCCATGTCGGCCGCGACGCGTG	81
prVMGsalF	ctttagGTCGACCACGGCTCGAACGAACCGGA	69
RpusQuCrbSflF2.0	CGTTCCGCGAAGCCGAACAGGGGCTGCGCCGCGCCAATGA	79
RpusQuCrbSflR2.0	ATGTTTTTCGATGGCGCCTTGCAAGAGCTTGCGGTTGAAATGCAGCG	74
RpuSQuCrbSfrF2.0	CACGCGTCGCGGCCGACATGGGGCTGCGCCGCGCCAATGA	81
RpuSQuCrbSfrR2.0	ATCTGCGAGAGCGCCGTCTGCAGGAGCTTGCGGTTGAAATGCAGCG	76
UidA	GGGTTGGGGTTTCTACAGGA	55

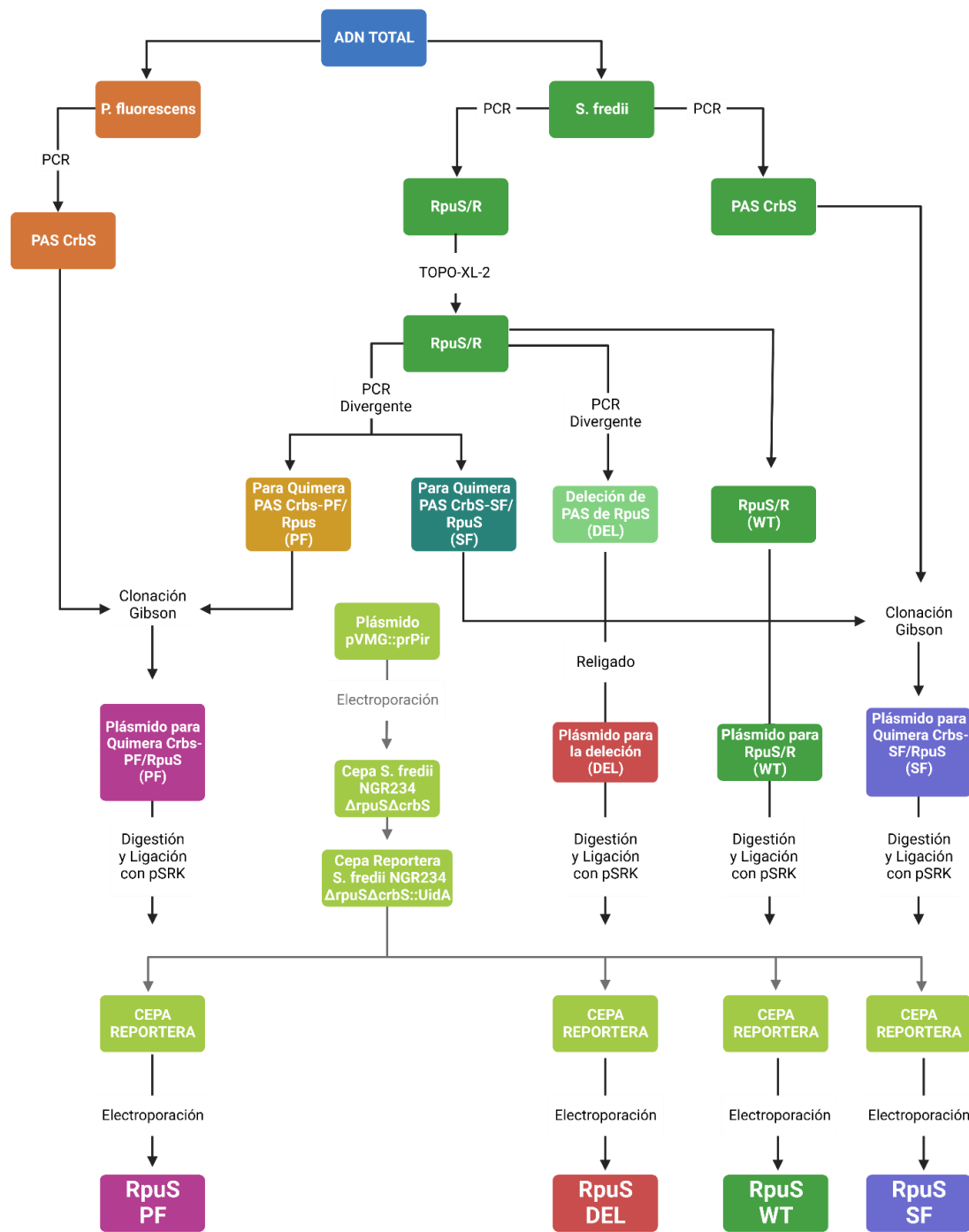


Figura 6. Diagrama de la metodología utilizada para obtener una cepa reportera con diferentes construcciones del sistema de dos componentes RpuS/R en *Sinorhizobium fredii*. Uno es el control (WT), otro contiene la delección del dominio PAS (DEL) y dos son proteínas quiméricas (SF y PF).

6.4.2 Recuperación de la cepa de *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$

Para preparar las células electrocompetentes se recuperó la cepa de *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ (Tabla I). A partir del resguardo en glicerol, se realizaron cultivos en medio sólido Py (para un litro: caseína 6 g, extracto de levadura 3 g, cloruro de calcio 0.38 g y agar 15 g) con rifampicina 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Rif) y se incubaron a 30°C durante la noche, seguido de un cultivo en medio líquido Py a 30°C y 150 rpm. A partir del cultivo líquido se realizó la limpieza de las células electrocompetentes, se emplearon dos tubos de 50 mL cada uno con 25 mL de cultivo, se realizaron centrifugaciones a 227 rcf, a una temperatura de 4°C durante 10 min. Se tiró el sobrenadante y se agregó 30 mL de agua destilada, se repitió una centrifugación y se agregaron 25 mL de glicerol (10%). Se centrifugó una tercera vez y se desechó el sobrenadante, se resuspendieron ambos pellets en 1 mL de glicerol (10%) y se realizaron alícuotas de 100 μL , las cuales se resguardaron a -80°C.

6.4.3 Transformación de la cepa de *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ con el plásmido pVMG::prPir

Las células electrocompetentes de *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ fueron transformadas con el plásmido recuperado pVMG::prPir (Tabla I y Fig. 6) mediante electroporación. Para ello se utilizó el sistema de electroporación Gene Pulser de Bio-Rad con el programa precargado para *Agrobacterium tumefaciens*. Se emplearon 3 μL (~150 ng) de plásmido y 100 μL de células electrocompetentes en cada cubeta, dos cubetas de 1mm y dos de 2mm. Tras la descarga eléctrica se le agregó 1 mL de medio Py líquido a cada cubeta, se pasó el contenido a tubos de centrifuga de 15 mL, se incubaron a 30°C y agitaron a 150 rpm durante cuatro horas. Posteriormente el contenido fue vertido a tubos de 5 mL y centrifugados a 227 rcf. Se tiró el sobrenadante, el pellet fue plaqueado en medio sólido Py gentamicina (Gm) (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubado a 30°C durante tres días.

Para confirmar la integración adecuada, se realizó una extracción de ADN total con los métodos del kit Gentra Puregene Yeast/Bact. (Qiagen). Mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% se confirmó la presencia del ADN. Se realizó una PCR con un termociclador (MiniAmp Plus Thermal Cycler de Applied Biosystems) con el ADN en concentración del 1% (~1 ng/ μL), se emplearon los primers prVMGsalF y UidA (Tabla II) para confirmar la presencia del fragmento de interés. Para cada reacción se empleó: 41.75 μL H_2O , 5 μL de 10X DreamTaq buffer (1X), 1 μL dNTPs (200 μM), 1 μL de cada primer (0.2 μM c/u), 0.25 μL de la polimerasa DreamTaq (1.25 U/50 μL PCR) con una temperatura de anillación de 60°C y un tiempo de 15s). Una vez comprobada la transformación, la cepa fue criopreservada en medio líquido Py al 35% glicerol a -80°C.

6.5 Generación de genes deletados y quiméricas

6.5.1 Extracción de ADN total de *Pseudomonas fluorescens* SBW25

Se obtuvo ADN total de *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (Tabla I y Fig. 6) a partir de un resguardo en glicerol. Primero se realizaron cultivos en medio sólido LB, se incubaron a 30°C durante 24 horas. La extracción se realizó con los métodos del kit Gentra Puregene Yeast/Bact. (Qiagen).

6.5.2 Recuperación del plásmido pSRK Gm.

Se realizaron tres minipreps concentrados de la cepa *E. coli* TOP10 pSRK Gm (del stock del laboratorio, Tabla I y Apéndice I) debido a que es un plásmido con un número muy bajo de copias, con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic. Posteriormente se realizó una digestión con la enzima NdeI (enzima 1 μL (1 U), plásmido 8 μL (~1 μg), buffer Fast

Digest 2 μL y 9 μL de H_2O) para linealizar el plásmido y confirmar su tamaño mediante una electroforesis con gel de agarosa al 1%.

6.5.3 Construcción de pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI

Para amplificar los genes del sistema de dos componentes RpuS/R que consta de 4200 pb, se realizaron dos PCR con el ADN total de *S. fredii* (stock del laboratorio, Tabla I y Fig. 6). Una con ADN en concentración de 1% ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) y el otro sin dilución, se emplearon los primers c22760NdeF y b22750HindIII (Tabla II). Las reacciones fueron de 50 μL , cantidades empleadas: polimerasa Phusion High Fidelity 0.5 μL (0.02 U/ μL), 5X Buffer High Fidelity 10 μL (1X), dNTPs 1 μL (200 μM), DMSO 1.5 μL (3%), H_2O 32 μL y 2.5 μL (0.5 μM) de cada primer (temperatura de alineación de 62 $^\circ\text{C}$ y tiempo de extensión de 70 s). Se confirmó la presencia de los fragmentos mediante una electroforesis, debido a que presentaba inespecificidades se cortó el gel de agarosa y se procedió con la purificación del ADN con el kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR purification Combo, acorde a las indicaciones de la empresa. Finalmente se confirmó la purificación del ADN mediante una electroforesis.

El fragmento RpuS/R fue clonado en el vector TOPO XL-2 (Tabla I, Fig. 6 y Apéndice I). Esta reacción de clonación se realizó duplicada: una con duración de 5 min y otra de 30 min. Cada reacción consistió en: 4 μL del producto de PCR purificado (RpuS/R), 1 μL del vector TOPO XL y 1 μL de solución salina. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la transformación mediante choque térmico con células competentes de *E. coli* DH5 α en medio sólido LB Km (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para lo anterior se descongelaron las células químicamente competentes en hielo (100 μL), una vez líquidas se les agregó el plásmido ($\sim 100 \text{ ng}$) y se dejaron en hielo 30 min. Después se incubaron a 42 $^\circ\text{C}$ durante 2 min, luego se regresaron al hielo por 5 min, se les agregó

1 mL de LB líquido y se dejaron incubando a 37°C durante 40 min. Finalmente se centrifugaron a 227 rcf durante 5 min, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en el mismo líquido restante y se plaqueó en medio sólido LB Km (50 µg/mL). Se extrajo el ADN plasmídico de varias colonias mediante el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic, luego se realizó la digestión de los mismos con la enzima de restricción EcoRI (enzima 1 µL (1 U), buffer FastDigest 2 µL, ADN 10 µL (~1µg) y 7 µL de H₂O), a una temperatura de 37°C durante 15min. Se realizó un resguardo de las clonas positivas en glicerol de TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI.

6.5.4 Delección del dominio PAS de *RpuS*

Se realizó una PCR divergente para eliminar la región correspondiente al dominio PAS de *rpuS* (Fig. 6). Para ello se empleó el plásmido TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI de 7812 pb, se utilizaron los primers DelPasRpuSF2.0 y DelPasRpuSR2.0 (Tabla II), a una temperatura de alineamiento de 67 °C y tiempo de extensión de 60 s . Las reacciones fueron de 50 µL, cantidades empleadas: polimerasa Phusion High Fidelity 0.5 µL (0.02 U/µL), Buffer GC 10X 5 µL (1X), dNTPs 1 µL (200µM), DMSO 1.5 µL (3%), H₂O 37 µL y 2.5 µL (0.5 µM) de cada primer. Se purificó con el kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR purification Combo. El producto fue religado a temperatura ambiente durante 24 horas empleando: enzima T4 DNA Ligasa 1 µL, Buffer T4 2 µL, ADN 5 µL y H₂O 12 µL. Posteriormente fue digerida la ligación con 1 µL de la enzima de restricción DpnI a 37 °C durante 15 min, esto para eliminar el plásmido metilado (templete). Se transformó mediante choque térmico con células *E.coli* DH5α químicamente competentes como fue descrito anteriormente (sección 6.5.3). Se extrajo el plásmido de las colonias positivas con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic y se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1% para confirmar su presencia. Posteriormente se realizó una digestión de la

delección con la enzima de restricción XhoI (enzima 1 μ L (1 U), ADN 5 μ L (~1 μ g), Buffer FastDigest 2 μ L y 12 μ L de H₂O) durante 15 min a 37 °C. Lo anterior para linealizar el plásmido y poder confirmar el tamaño en una electroforesis con gel de agarosa al 1%.

6.5.5 Generación de genes quiméricos

Se amplificaron por PCR a partir de ADN total las regiones correspondientes al dominio PAS de *crbS* de *S. fredii* y *crbS* de *P. fluorescens* y se realizaron dos PCR divergentes con TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI específicos para cada amplicon (Fig. 6).

Primero, mediante una PCR a partir del ADN total de *S. fredii* se obtuvo el dominio PAS de *crbS* empleando los primers PASfrQuF2.0 y PASfrQuR2.0 (Tabla II) mediante una PCR de dos pasos en el que se combinaron los pasos de alineamiento y extensión en un solo paso de 1 minuto con una temperatura de alineamiento de 72 °C. Con el ADN total de *P. fluorescens* se utilizaron los primers PASflQuF2.0 y PASflQuR2.0 (Tabla II) a una temperatura de alineamiento de 65 °C para obtener el dominio PAS de *crbS*. Las reacciones fueron de 50 μ L, cantidades empleadas: polimerasa Phusion High Fidelity 0.5 μ L (0.02 U/ μ L), 5X Buffer High Fidelity 10 μ L (1X), dNTPs 1 μ L (200 μ M), DMSO 1.5 μ L (3%), H₂O 32 μ L y 2.5 μ L (0.5 μ M) de cada primer. Se realizó la purificación de ambos con el kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR purification Combo.

Segundo, se realizaron las PCR divergentes con TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI para cada amplicon. En el caso del dominio PAS de *S. fredii* se utilizaron los primers RpuSQuCrbSfrF2.0 y RpuSQuCrbSfrR2.0 (Tabla II) para obtener el fragmento de interés y para el PAS de *P. fluorescens* se emplearon los primers RpusQuCrbSflF2.0 y RpusQuCrbSflR2.0 (Tabla II) para obtener el producto deseado. En ambos casos se emplearon tres temperaturas: 67, 69 y 71 °C. Se realizó la purificación acorde al kit PureLink Quick Gel Extraction and PCR purification Combo.

Tercero, se realizó la clonación tipo Gibson de cada inserto dominio PAS con su respectivo PCR divergente de TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI. La reacción empleó: plásmido 2 μ L, inserto 8 μ L y 10 μ L de Master Mix HiFi (Gibson). Las reacciones se incubaron durante 30 min a 50°C y fueron transformadas mediante choque térmico con células competentes *E.coli* DH5 α en medio LB Km (50 μ g/mL), como fue previamente descrito.

Finalmente se realizó la extracción del ADN plasmídico de las transformaciones de TOPO XL-2::RpuS/R (modificado, Apéndice I) con el PAS de Crbs de *S. fredii* y el que contiene el PAS de *P. fluorescens* de tres fechas con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic. Mediante PCR se verificó que se tuviese el inserto adecuado en las dos quimeras. Para la quimera PAS CrbS-SF/RpuS (abreviado SF), se emplearon los primers PASfrQuF2.0 y c22760HindR (Tabla II) para obtener el fragmento de interés. En la quimera PAS CrbS-PF/RpuS (abreviado PF) se utilizaron los primers PASflQuF2.0 y c22760HindR. En ambos casos la temperatura de alineamiento fue de 65 °C y un tiempo de extensión de 15 s. Se realizó un resguardo en glicerol de las colonias exitosas para ambas quimeras.

6.6 Expresión de las proteínas quimérica en *S. fredii* NGR234 Δ rpuS Δ crbS

6.6.1 Digestión de plásmidos con las enzimas de restricción NdeI e HindIII

Se inició con la digestión de los plásmidos: PF, SF, DEL, WT y pSRK, con las enzimas de restricción NdeI y HindIII (ADN 10 μ L, buffer FastDigest 5 μ L, 33 μ L de H₂O y 1 μ L de cada enzima), se incubaron a 37 °C durante 30 min (Fig. 6). Debido a que en PF, SF, DEL y WT se encuentran en el plásmido TOPO XL con los sitios de restricción NdeI e HindIII, se agregó la enzima de restricción BcuI para eliminar el fragmento de ADN entre los sitios de restricción NdeI a HindIII en TOPO XL ya que éste (BcuI) se encuentra justo en medio de ambos y así se pudo

evitar su unión al plásmido pSRK. De este modo se aseguró que el inserto RpuS/R quedara ligado en el plásmido pSRK con los sitios de restricción NdeI e HindIII.

6.6.2 Ligaciones de los genes quiméricos de *rpuS* en el plásmido pSRK Gm

Se realizaron las ligaciones de cada RpuS/R quimérico y de la delección con el plásmido pSRK (Fig. 6), se dejaron durante 24 horas a temperatura ambiente, la reacción implicó: pSRK 1 μ L, inserto (PF 3 μ L, SF 1 μ L, DEL_v 6 μ L, DEL_n 1 μ L), buffer FastDigest 1 μ L, Ligasa 1 μ L y 10 μ L de H₂O. Después se realizaron las transformaciones mediante choque térmico con células competentes *E.coli* DH5 α como fue descrito anteriormente, se incubaron durante 24 horas en medio sólido LB gentamicina (Gm) (30 μ g/mL). Se realizó la extracción del plásmido en las colonias seleccionadas con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic. Luego se realizaron digestiones de los minipreps con las enzimas NdeI y HindIII durante 15 min a 37°C (ADN 10 μ L (~1 μ g), buffer FastDigest 2 μ L, 6 μ L de H₂O y 1 μ L (1U) de cada enzima). Se realizó un resguardo en glicerol de las colonias exitosas de PF, DEL y WT. Se repitió la digestión, ligación y transformación de SF con el plásmido pSRK Gm. Se realizó la extracción del ADN plasmídico de SF con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep de Bio Basic, seguido de su digestión con las enzimas de digestión NdeI y HindIII (ADN 10 μ L (~1 μ g), buffer FastDigest 2 μ L, 6 μ L de H₂O y 1 μ L (1 U) de cada enzima).

6.6.3 Transformación de la cepa reportera *S. fredii* NGR234 Δ *rpuS* Δ *crbS* *prPir::Uida*

La cepa *S. fredii* NGR234 Δ *rpuS* Δ *crbS* *prPir::Uida* (Tabla I y Fig. 6) fue transformada mediante electroporación con el plásmido pSRK Gm con los diferentes constructos: PF, SF, DEL, WT. Se prepararon células electrocompetentes de la cepa *S. fredii* NGR234 Δ *rpuS* Δ *crbS* *prPir::Uida* como se describió previamente. Se realizó la electroporación con los plásmidos (3 μ L

de plásmido y 100 μ L de células electrocompetentes) en cubetas de 1 mm y de 2 mm, se plaquearon en medio sólido Py con gentamicina (30 μ g/mL) y kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron a 30 °C durante tres días. Se realizó un resguardo con las colonias seleccionadas de cada transformación.

6.7 Ensayos GUS

Se preparó el medio mínimo incompleto agregando 1 mL de cada una de las vitaminas B12, tiamina, ácido nicotínico, pantotenato y biotina, cada una a una concentración final de 20 mM, 1 mL de los elementos traza Nitsch a 1000x (para 1L a 1000x: 0.5 mL de H₂SO₄, 2.2 g de MnSO₄, 0.5 g de ZnSO₄, 0.5 g de H₃BO₃, 0.016 g de CuSO₄, 0.025 g de Na₂MoO₄ y 0.046 g de CoCl₂·6H₂O), 5 mL de CaCl₂ a 200 mM, se esterilizó en una autoclave 121°C durante 15 min, posteriormente se agregaron las sales previamente esterilizadas en autoclave (2.5 g de NaNO₃, 1.0 g, de KH₂PO₄, 2.0 g de K₂HPO₄, 0.3 g de MgSO₄·7H₂O, 0.1 g de NaCl y 0.01 g de FeCl₃). Justo antes de ser requerido como medio mínimo completo se agregó la fuente de carbono para obtener una concentración final de 20 mM (piruvato o acetato) y el IPTG a una concentración de 200 μ M.

A continuación, se realizaron cultivos con las diferentes cepas generadas a partir de los resguardos en glicerol, empleando tres colonias de cada cepa en medio sólido Py Gm (30 μ g/mL) Km (50 μ g/mL): WT, SF, PF y DEL. En medio sólido Py Km (50 μ g/mL) se realizaron cultivos del control: NGRC30. Se dejaron incubando a 30 °C durante cinco días. A partir de los cultivos sólidos se eligieron dos colonias para realizar cultivos líquidos, de 10 mL cada uno, en medio Py Km (50 μ g/mL) y se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron a 227 rfm durante 8 min, el paquete celular se suspendió en 5 mL de medio incompleto y fue centrifugado en las mismas condiciones.

Para el ensayo GUS con piruvato: en un matraz se agregaron 100 mL de medio incompleto, se adicionó de la fuente de carbono (piruvato) a una concentración final de 200 μM (1,250 μL) y el IPTG a una concentración final de 200 μM (160 μL). Así generando el medio completo, el cual fue agregado en cantidad de 10 mL a cada matraz (un matraz por muestra, en total 10). Se resuspendió el pellet de cada muestra y se adicionó a su respectivo matraz. Se incubaron durante la noche a 30 °C y 150 rpm.

Para el ensayo GUS con acetato: en un matraz se agregaron 100 mL de medio incompleto, se adicionó acetato a una concentración final de 20 μM y el IPTG a una concentración final de 200 μM , posteriormente se agregaron 10 mL a cada matraz por muestra (en total 10) y se resuspendió el pellet de cada muestra y se adicionó a su respectivo matraz. Se incubaron durante la noche a 30 °C y 150 rpm.

La densidad óptica de cada muestra se midió a 600nm con un lector de placas Multiskan Sky (Thermofisher). Se tomó 1 mL de cada muestra, se pasó a un tubo de microcentrífuga y fueron centrifugados (triplicado para cada muestra). El paquete celular se resguardó a -80°C previo al análisis.

Para la realización del ensayo GUS, se preparó primero el buffer GUS que consta de 20 mL de buffer fosfatos (6.15 mL K_2HPO_4 1M, 3.85 mL KH_2PO_4 1M y 90 mL de H_2O) a 0.1M pH7 (final 50mM), 4 μL de β - mercaptoetanol 14.3M (final 14mM) y 19.996 mL de H_2O . Luego, se sacaron las células del congelador y se resuspendieron en 1mL de buffer GUS y se incubaron a 37 °C en un termoblock durante 5 min. Se agregó a cada tubo con células (DEL, WT, PF, SF, NGRC30): 20 μL de SDS 0.1% y 40 μL de cloroformo, después se agitaron en un vortex a máxima velocidad durante 20s. Se incubaron durante 5 min a 37 °C. Después se les agregó 10.1 μL de 4-

Nitrofenil β -D-glucopiranosido (PNPG) 100 mM (final 1 mM) y se incubaron a 37°C y 1500 rpm durante 3 min. Finalmente se agregaron 400 μ l de Na₂CO₃ a 0.4 M, fueron centrifugados a 1000 rcf, se midió a 450 nm y se calculó la actividad relativa (con la fórmula $T = T_f - T_0$, $1000 \times A_{415}/TxA_{600}$). La comparación entre la actividad de las fusiones transcripcionales se realizó mediante una ANOVA de una vía seguida de prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples utilizando SPSS versión 25 (IBM).

7. Resultados

7.1 Construcción de la cepa reportera

Se confirmó mediante una digestión con las enzimas de restricción BamHI y SalI la presencia del plásmido pVMG de 6608 pb (empleado como referencia) y del plásmido pVMG::prPir con los dos fragmentos esperados, el del inserto de 380 pb y el del plásmido de 6608 pb. Se obtuvo una sola banda para el plásmido sin inserto mientras que el plásmido pVMG::prPir se observaron dos, pero debido a la pobre visualización de la banda de 380 pb, se realizó una segunda confirmación mediante PCR en la que se obtuvo un resultado claro del producto de 380 pb (Fig. 7, carriles 3 y 4), se utilizó de nuevo como referencia el plásmido pVMG que como se esperaba no generó la amplificación del inserto ya que carece del mismo (Fig. 7, carriles 1 y 2). El plásmido pVMG::prPir contiene el gen uidA que codifica para β -glucuronidasa bajo el control del promotor de piruvato (M. Gao et al., 2019).

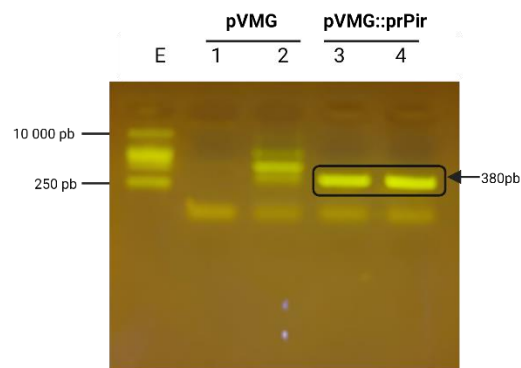


Figura 7. Electroforesis de las PCRs de los plásmidos pVMG y pVMG::prPir. Producto de PCR empleando pVMG (1 y 2) y pVMG::prPir (3 y 4), solo con el plásmido pVMG::prPir se generó el producto buscado, confirmando la integración adecuada. Fragmento de 380 pb (inserto) marcado con un rectángulo negro. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Se recuperó la cepa de *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS$ $\Delta crbS$, la cual carece de los sensores SLC5/STAC para acetato y piruvato, luego de realizar la limpieza de las mismas se obtuvieron las células electrocompetentes listas para la electroporación con el plásmido pVMG::prPir.

De las cuatro repeticiones de la electroporación, solo una realizada en una cubeta de 2 mm generó colonias. De las diez colonias seleccionadas para la extracción de ADN total, se obtuvieron resultados satisfactorios en seis (Fig. 8).

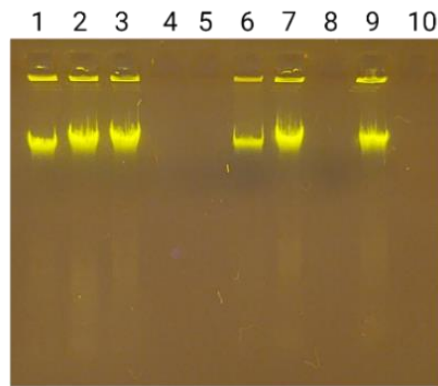


Figura 8. Electroforesis de la extracción de ADN total de las colonias seleccionadas de la cepa *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS$ $\Delta crbS$. Se obtuvo ADN en 1-3, 6, 7 y 9.

Un PCR con los primers prVMGsalF y uidA generarían un fragmento de 436 pb que iniciaría en el promotor de piruvato y terminaría en el gen *uidA*, de tal modo que solo las células transformadas correctamente generarían un producto. Esto se confirmó en las seis colonias empleadas mediante una electroforesis de los productos generados por PCR (Fig. 9).

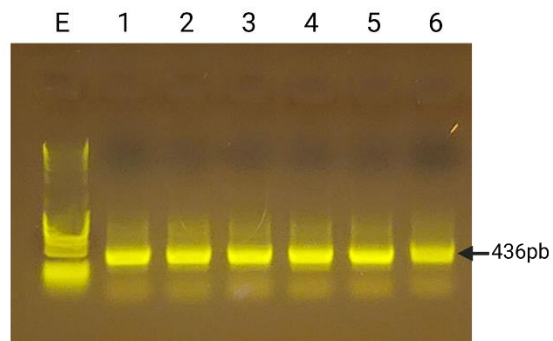


Figura 9. Electroforesis del producto de PCR mostrando el fragmento de 436 pb en las seis colonias seleccionadas. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Estos resultados confirman la integración del gen de interés en el cromosoma de *S. fredii* NGR234, éste será un reportero para la actividad del prPir dando lugar a la cepa reportera *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ prPir::*Uida* (Tabla I y Fig. 6). Debido a que se pudo confirmar en las seis muestras, se realizó un resguardo de todas en glicerol a -80°C .

7.2 Obtención de genes deletados y quiméricos

De las colonias obtenidas a partir del cultivo sólido de *Pseudomonas fluorescens* SBW25, se seleccionaron cuatro para la extracción de ADN total, se obtuvo un resultado positivo en todos los casos (Fig. 10). Las extracciones se utilizaron posteriormente para la extracción del dominio PAS de CrbS/R.

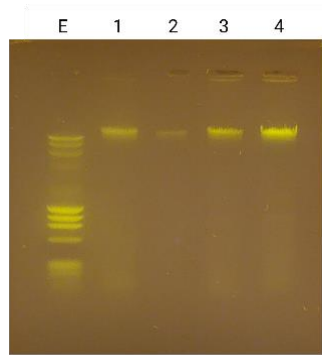


Figura 10. Electroforesis de ADN total obtenido de cuatro colonias de *P. fluorescens*. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

7.2.1 Verificación de pSRK Gm

Mediante la digestión de los tres minipreps con la enzima NdeI se pudo generar la linealización del plásmido pSRK Gm (5742 pb) y se confirmó su presencia mediante una electroforesis (Fig. 11). Se obtuvo una digestión eficiente en el primer carril, ya que en el 2 y 3 la banda inferior que se observa, son plásmidos que no se linealizaron adecuadamente. Debido a lo anterior se seleccionó el plásmido del primer carril para los experimentos. El plásmido pSRK, es un vector de expresión que contiene un complejo modificado promotor-operador lac^q -lac en el que los genes clonados son reprimidos en la ausencia del inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Khan et al., 2008).

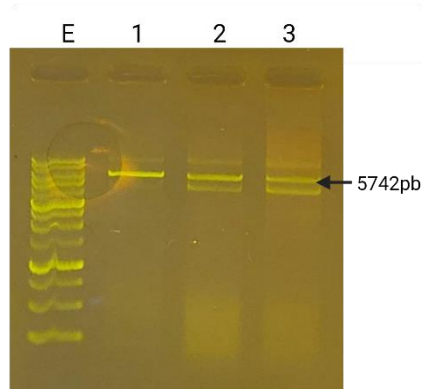


Figura 11. Electroforesis de la linealización de tres minipreps del plásmido pSRK Gm. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

7.2.2 Obtención de pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI

El producto de PCR de 4200 pb, que consta del sistema de dos componentes RpuS/R, fue confirmado mediante una electroforesis (Fig. 12). Debido a que se presentaban inespecificidades se realizó una electroforesis para cortar el gel para la purificación del ADN y nuevamente se confirmó su presencia mediante electroforesis.

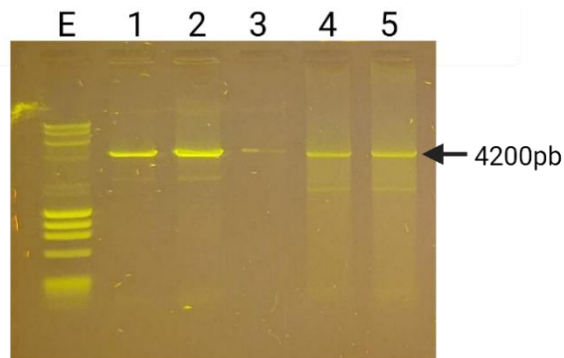


Figura 12. Electroforesis de amplificación de RpuS/R. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

El fragmento RpuS/R fue clonado en TOPO XL-2 y transformado en *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron colonias con la reacción TOPO XL de 5 min y 30 min. De las digestiones de las minipreps de las cuatro colonias seleccionadas, se confirmó el resultado de la clonación en dos,

mediante la presencia del fragmento del plásmido de 3938 pb y dos fragmentos correspondientes al inserto RpuS/R de 2700 pb y 1526 pb en la electroforesis (Fig. 13). Así obteniendo pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI el cual fue resguardado en glicerol.

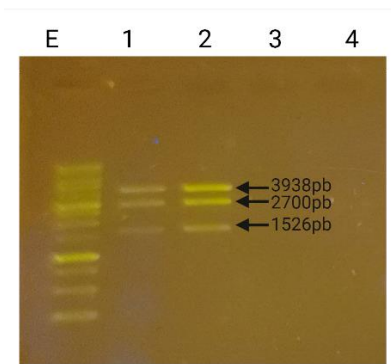


Figura 13. Electroforesis de las digestiones de las cuatro minipreps de pTOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI. Se observan los dos fragmentos buscados: el plásmido de 3938 pb y los dos fragmentos correspondientes al inserto RpuS/R de 1526 pb y 2700 en 1 y 2, mientras que en 3 y 4 no se obtuvo éxito. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

7.2.3 *RpuS* con la delección del dominio PAS

Se confirmó el producto de la PCR divergente a partir de TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI de 7812 pb para la delección del dominio PAS en *RpuS* mediante una electroforesis en la que se obtuvo el fragmento de 7461 pb (Fig. 14A). La purificación se verificó mediante una electroforesis (Fig. 16a), después fue religado y digerido para finalmente ser transformado en *E. coli*.

La transformación en *E. coli* generó abundantes colonias, de las colonias seleccionadas se realizaron minipreps que fueron digeridos para linealizar el plásmido y confirmar su presencia mediante una electroforesis, se encontró el fragmento esperado de 7461 pb (Fig. 14B) y se realizó el resguardo en glicerol de la delección (denominada DEL).

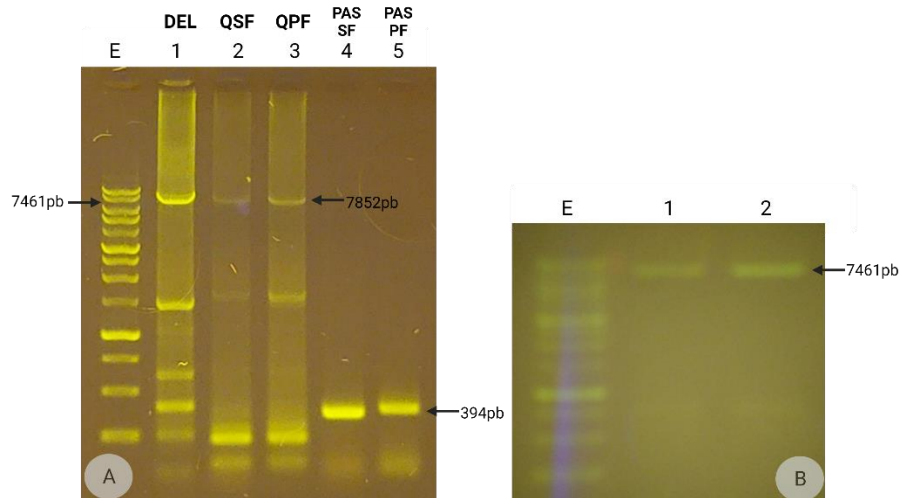


Figura 14. Construcción de quimeras. A) PCR divergente para la delección de PAS de RpuS/R (1), producto de PCR divergente a partir de TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI para el amplicon del dominio PAS de *S. fredii* (QSF) (2) y en el que es específico para el dominio PAS de *P. fluorescens* (QPF) (3), ambos de 7852 pb. Amplificación del dominio PAS de *crbS* de *S. fredii* de 382 pb (PAS SF) (4) y de PAS de *crbS* de *P. fluorescens* de 394 pb (PAS PF) (5) . B) Electroforesis del plásmido TOPO XL-2 linealizado que contiene la delección del dominio PAS de *RpuS*. QSF= producto de PCR divergente para quimera RpuS con inserto PAS de *S. fredii*. QPF= producto de PCR divergente para quimera RpuS con inserto PAS de *P. fluorescens*. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

7.2.4 Genes quiméricos obtenidos

Se obtuvo la amplificación del dominio PAS de *crbS* de 382 pb de *S. fredii* (Fig. 15b) y el dominio PAS de *P. fluorescens* de *crbS* de 394 pb (Fig. 15c) y se confirmaron mediante una electroforesis (Fig. 14A, 4 y 5, respectivamente).

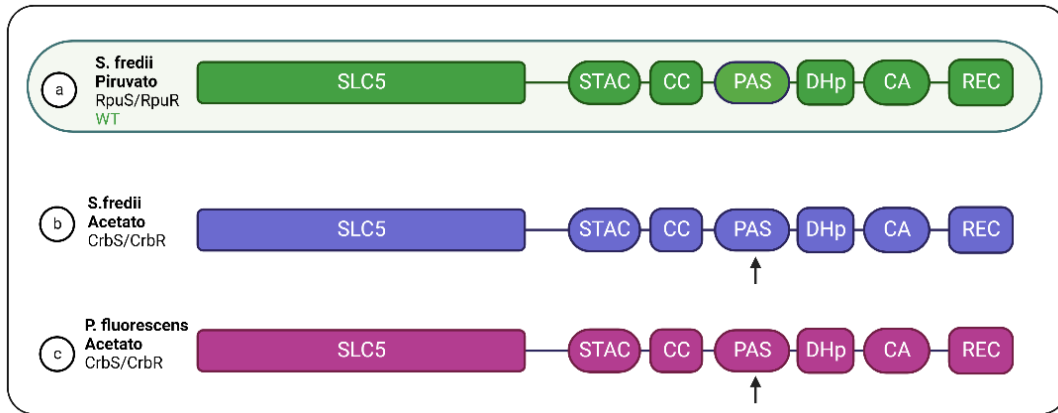


Figura 15. Sistemas de dos componentes utilizados. SDC RpuS/R de *S. fredii* WT (a), SDC CrbS/R de *S. fredii* (b) y SDC CrbS/R de *P. fluorescens* (c). El dominio PAS de b y c está señalado con una flecha y fueron integrados en el SDC RpuS/R.

Los productos de las PCR divergentes realizadas en el SDC RpuS/R en TOPO XL-2::RpuS/R-EcoRI específicas para cada amplicon fueron confirmadas mediante una electroforesis, en ambos casos se esperaba un fragmento de 7852 pb (Fig. 14A, 2 y 3).

Todos los productos fueron purificados para eliminar inespecificidades y se comprobaron mediante una electroforesis (Fig. 16).

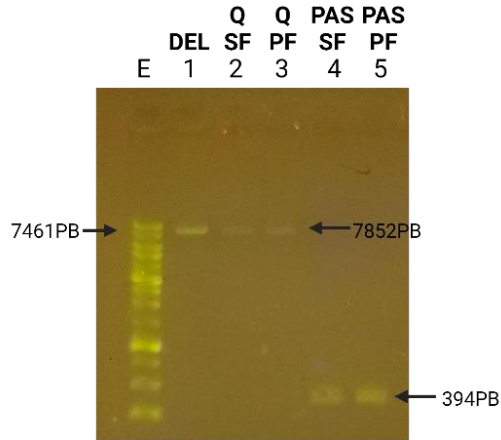


Figura 16. Electroforesis de las purificaciones. Delección (1), PCR divergente específico para el amplicon PAS CrbS de *S. fredii* (QSF) (2) y para el amplicon PAS de CrbS de *P. fluorescens* (QPF) (3), PAS de *S. fredii* de CrbS (4) y PAS de *P. fluorescens* de CrbS (5). E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Las clonaciones Gibson de cada inserto dominio PAS con su respectivo PCR divergente TOPO XL-2::RpuS/R fueron verificadas posteriormente a las transformaciones de las clonaciones. Se realizaron minipreps de las colonias seleccionadas y se verificó mediante PCR que las dos quimeras tuviesen el inserto adecuado. En la quimera PAS CrbS-SF/RpuS (abreviada SF) se obtuvo el fragmento de interés de 1600 pb en dos de las cuatro colonias probadas, mientras que en la quimera PAS CrbS-PF/RpuS (abreviada PF) se obtuvo un fragmento de 1600 pb en tres de las cuatro colonias probadas, por lo que en ambos casos se confirmó la clonación Gibson exitosa que generó a las quimeras de interés (Fig. 17), se realizó un resguardo en glicerol de las adecuadas.

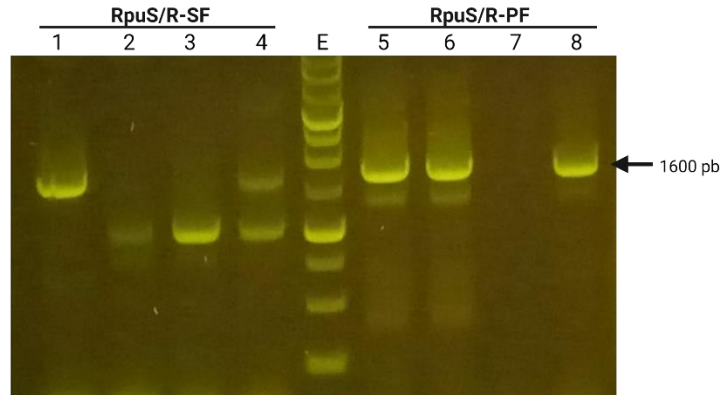


Figura 17. Electroforesis de las amplificaciones de las dos quimeras. Quimera SF (RpuS/R-SF) de 1-4, con éxito en 1 y 4. Quimera PF (RpuS/R-PF) de 6-9, con éxito en 5, 6 y 8. En algunos carriles se observan inespecificidades de ~1000pb. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

7.3 Obtención de las cuatro cepas diseñadas empleando la cepa reportera y las ligaciones de los genes quiméricos de rpuS en pSRK Gm

Se confirmaron los fragmentos esperados con las digestiones NdeI y HindIII de PF (4182 pb), SF (4178 pb), DEL (3828 pb), WT (4179 pb) (RpuS/R) y pSRK GM (5618pb) (Fig. 18A). El fragmento del plásmido TOPO XL en el que se encontraban (excepto pSRK Gm) es de ~3956 pb. Debido a que en DEL y WT se evidenciaron bandas de plásmido sin digerir, se repitió la digestión con ambos con las mismas enzimas (identificados como DEL 2d y WT 2d). También se realizaron otras digestiones con las mismas muestras de DEL con una menor cantidad de plásmido (8 μ L en vez de 10 μ L) para intentar obtener un mejor resultado. La digestión con BcuI fue realizada en todas las muestras (PF, SF, DEL, DEL 2d, WT y WT 2d) y se verificó mediante una electroforesis (Fig. 18B), esta última digestión fue con el propósito de eliminar la posibilidad de interferencia con el fragmento del plásmido TOPO XL, ya que no fue posible cortar el gel debido a la similitud de tamaños y proximidad en el gel. Se generó una mejor digestión empleando una menor cantidad

de plásmido (8 μ L) en DEL y WT (18B 3 y 5, respectivamente), equiparable con las que fueron digeridas dos veces (18B 4 y 6, respectivamente).

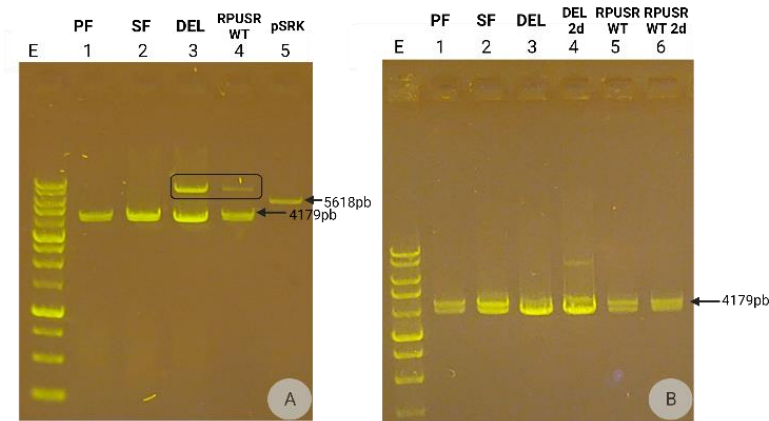


Figura 18. Construcción de plásmidos pSRK Gm. A) Electroforesis de la digestión con NdeI y HindIII de: PF (1), SF (2), DEL (3), WT (4) y pSRK Gm (5). Señalados con un rectángulo las bandas de plásmido que no fue digerido en 3 y 4. B) Electroforesis de la digestión con BcuI de: PF (1), SF (2), DEL d (3), DEL 2d (4), WT d (5), WT 2d (6). E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Finalmente, la última repetición de la digestión de PAS se realizó con muestras diferentes, con las enzimas BcuI, NdeI y HindIII y se obtuvo el resultado buscado, el cual fue confirmado con una electroforesis (Fig. 19). Se considera que se obtuvo un resultado muy similar a la otra digestión con 8 μ L de plásmido.

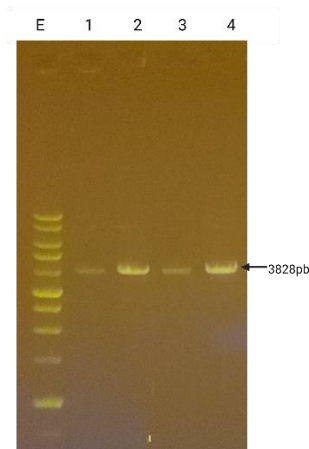


Figura 19. Electroforesis de la digestión de DEL. Empleando las enzimas BcuI, NdeI y HindIII, en todas se confirmó el fragmento de 3828pb (1-4). E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Las ligaciones de cada RpuS/R quimérico, WT y de la deleción con pSRK fueron transformadas en *E. coli* DH5 α . La verificación se realizó mediante electroforesis de los plásmidos extraídos. La ligación SF no fue exitosa (9796 pb), sin embargo, resultaron exitosas las de PF (9800 pb), DEL (9446 pb) y WT (9797 pb). Se confirmaron las ligaciones mediante digestiones con las enzimas NdeI y HindIII, con éxito en: PF, DEL y WT (Fig. 20) y se resguardaron en glicerol a -80°C.

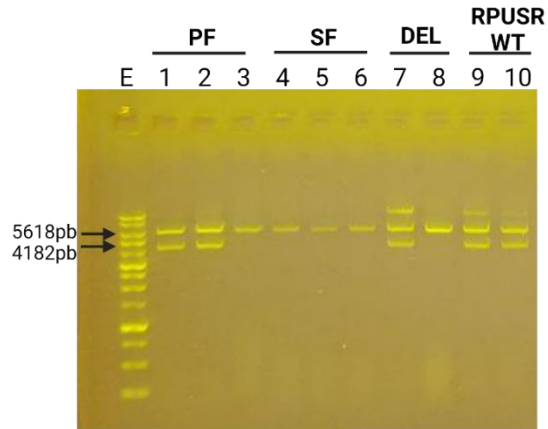


Figura 20. Comprobación de las construcciones en pSRK Gm mediante una digestión con las enzimas NdeI y HindIII. Electroforesis de las digestiones de las minipreps: PF (1-3), SF (4-6), DEL (7 y 8) y WT (9 y 10). E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

Posteriormente se logró la ligación de SF en pSRK empleando 1, 2, 3 y 5 μ L de inserto y 1 μ L de pSRK. Esto se confirmó mediante una electroforesis: el de RpuS/R de 4178 pb y el de pSRK de 5618 pb (Fig. 21). Es importante mencionar que en el primer intento se había utilizado 1 μ L de inserto también, pero sin éxito. En todas las muestras se obtuvieron los fragmentos esperados, solo en dos fue muy baja la concentración (en 3 y 10) por lo que fueron desechados, el resto se resguardó en glicerol a -80°C .

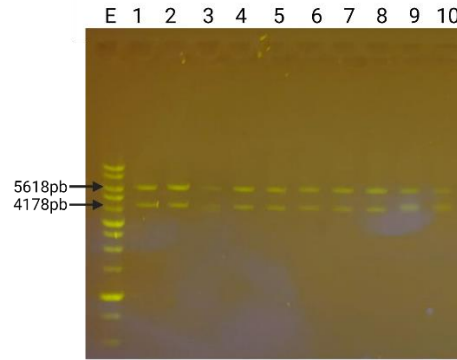


Figura 21. Electroforesis de las digestiones de las minipreps de SF mediante una digestión con las enzimas NdeI y HindIII. Todos los carriles muestran los dos fragmentos esperados: RpuS/R de 4178 pb y pSRK de 5618 pb. E= escalera (GoldBio 1kb), marcador molecular.

La cepa reportera *S. fredii* NGR234 Δ rpuS Δ crbS prPir::UidA que fue transformada mediante electroporación utilizando cubetas de 1mm y de 2 mm con cada uno de los plásmidos (SF, PF, DEL y WT), formó colonias en todas las transformaciones. Se realizó el resguardo en glicerol de las colonias seleccionadas: WT (4 colonias), PF (5 colonias), SF (3 colonias) y DEL (4 colonias) (Fig. 22).

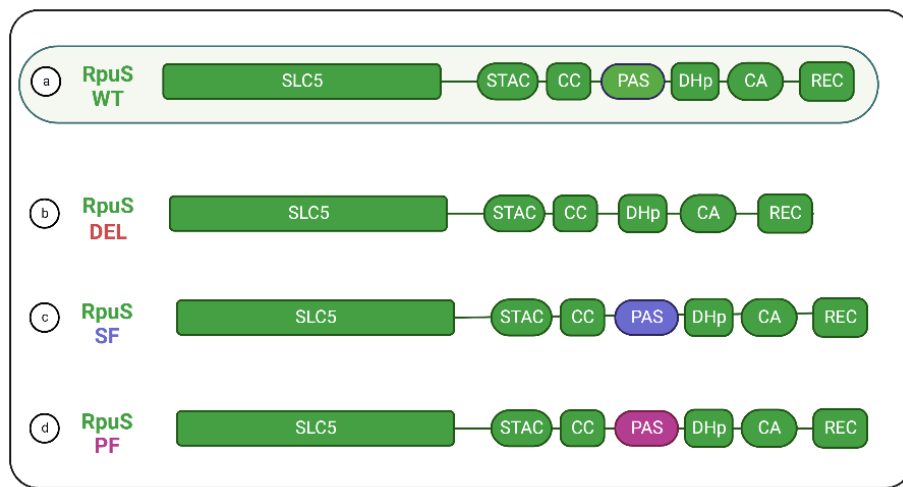


Figura 22. Diagrama de las cepas obtenidas. SDC RpuS/R de *S. fredii* WT (a), delección del dominio PAS en SDC RpuS/R (b), proteínas quiméricas: integración de PAS de SDC CrbS/R de *S. fredii* en RpuS/R (c) y la integración de

PAS de SDC CrbS/R de *P. fluorescens* en RpuS/R (d). a-d fueron integrados en la cepa reportera *S. fredii* NGR234 $\Delta rpuS \Delta crbS$ prPir::*UidA*.

7.4 Ensayos GUS

El gen *uidA* de *E. coli* codifica a la enzima β -glucuronidasa (GUS) y ha sido empleado como un sistema reportero de la expresión génica en fusiones transcripcionales en plantas (Jefferson et al., 1987) y en bacterias (M. Gao et al., 2019).

La fusión del promotor de piruvato al gen *uidA* permite monitorear la actividad del sistema de dos componentes RpuS/R. La enzima GUS al ser incubada con sustratos cromogénicos como 4-Nitrofenil β -D-glucopiranosido (PNPG) genera una coloración que puede ser cuantificada y que indica la cantidad de actividad del promotor de piruvato que presentan las diferentes fusiones empleadas.

La absorbancia obtenida en los cultivos de las diferentes cepas en medio mínimo con piruvato a 600 nm y después del ensayo GUS a 415 nm se muestran en la tabla III. Así como el tiempo empleado y la actividad relativa calculada. Mientras que para acetato se muestra en la tabla IV.

Tabla III. Resultados del ensayo GUS realizado con piruvato. Datos obtenidos a partir de tres repeticiones independientes.

Cepa	A _{600nm}	A _{415nm}	Tiempo (min)	Actividad Relativa
				Media \pm SD
SF	0.20	0.01	3.00	0.88 \pm 4.78
PF	0.34	0.02	3.00	2.34 \pm 0.26
DEL	0.27	0.02	3.00	1.98 \pm 2.04
WT	0.25	1.24	3.00	104.54 \pm 0.35
NGRC30	0.08	0.01	3.00	0.21 \pm 0.19

Tabla IV. Resultados del ensayo GUS realizado con acetato. Datos obtenidos a partir de tres repeticiones independientes.

Cepa	A _{600nm}	A _{415nm}	Tiempo (min)	Actividad Relativa
				Media \pm SD
SF	0.11	0.94	3.00	34.36 \pm 2.65
PF	0.19	0.01	3.00	0.57 \pm 0.14
DEL	0.11	0.03	3.00	0.92 \pm 0.83
WT	0.06	0.01	3.00	0.22 \pm 0.08
NGRC30	0.04	0.01	3.00	0.09 \pm 0.09

En piruvato las construcciones RpuS-PF y RpuS-SF, así como DEL y NGRC30 no presentaron una activación del promotor de piruvato; mientras que en acetato RpuS-PF, DEL, WT y NGRC30 tampoco tuvieron actividad (Fig. 23, a). La proteína WT tuvo la mayor cantidad de actividad en piruvato (Fig. 23, b). En piruvato, la quimera RpuS-SF tuvo una actividad relativa menor a WT (Fig. 23, b). Sin embargo, sí presentó actividad (Fig. 23, c).

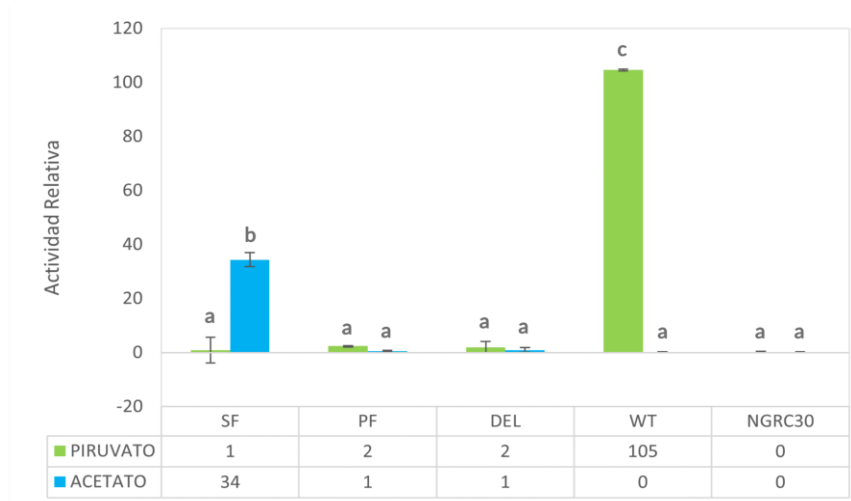


Figura 23. Gráfica de la actividad relativa para cada una de las cepas empleadas en piruvato y acetato. Datos obtenidos a partir de tres repeticiones independientes. La barra de error representa una desviación estándar (SD). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8. Discusión

La delección del dominio PAS en RpuS/R generó la eliminación de la activación del promotor de piruvato en los ensayos con piruvato y acetato, mostrando que es requerido el dominio PAS para sensar al sustrato de manera predominante al dominio SLC5. Existen estudios previos que apoyan estos resultados, en los que encontraron que el dominio SLC5 no era indispensable para la captación de la señal de detección del sustrato (Monteagudo-Cascales et al., 2019; Wirtz et al., 2020). Por otra parte, la cepa con la delección de ambos sistemas RpuS/R y CrbS/R, como se esperaba, no tuvo actividad en ninguno de los dos sustratos.

De manera general se reconoce la implicación del dominio PAS en la señalización en algunos sistemas de dos componentes (Borland et al., 2016; Monteagudo-Cascales et al., 2019; Wirtz et al., 2020). En un estudio se ha encontrado que la delección del dominio PAS en el sistema de dos componentes CbrA/B en *Pseudomonas putida* impidió la detección de la señal de activación lo cual es consistente con los resultados que se obtuvieron (Monteagudo-Cascales et al., 2019).

Se ha sugerido que en el sistema de dos componentes CbrA/B en *Pseudomonas putida* el dominio PAS pudiese reconocer a un metabolito intracelular aun no identificado que pudiese generar la percepción e iniciar la señalización en la histidina quinasa ya que la histidina parece no estar implicada. Por lo tanto, es posible hipotetizar que en RpuS/R de *S. fredii* el dominio PAS se una directamente al piruvato y en el caso de la quimera RpuS/CrbS-SF al acetato.

De las dos quimeras realizadas en esta tesis, RpuS-PF no fue funcional, es posible que la construcción no haya sido adecuada, por ejemplo, que el dominio PAS no haya sido substituido en la región correcta, o que el dominio PAS de *P. fluorescens* sea incompatible en el SDC de *P. fredii*. La quimera RpuS-PF logró sensar al acetato y activó al promotor de piruvato, aunque tuvo una

menor actividad que WT. Lo anterior podría ser debido a que no está optimizada para ello. Esta misma quimera no generó la activación del promotor en piruvato, evidenciando la necesidad del dominio PAS correspondiente para lograr sensar al sustrato. A futuro se podrían realizar estudios de crecimiento con la quimera RpuS/CrbS-SF para evaluar su capacidad de utilizar piruvato cuando se presenta junto a una baja concentración de acetato. Lo anterior es de particular interés cuando se consideran los retos a los que se enfrentan las bacterias en su medio natural, en contraste con las condiciones idóneas del medio de cultivo. En la naturaleza los nutrientes son escasos, se ha propuesto que los sensores de SDC de la familia SLC5/STAC, como reguladores de genes que permiten una detección temprana en condiciones de sustrato bajas favorecen la sobrevivencia (Ramos et al., 2022). En vida libre, es probable que los sistemas RpuS/R y CrbS/R pudiesen complementarse en ambientes altamente competitivos. En el SDC CrbS/R de *Thermus thermophilus*, en el operón en el que se encuentran los genes para el sistema de dos componentes, el cual interesantemente carece de un dominio PAS, existe un gen para otra proteína que sí contiene un dominio PAS (Gema García, comunicación personal). Es posible que estas dos proteínas interactúen y que la señalización sea percibida por el dominio PAS de la proteína adyacente permitiendo la activación de CrbS/R. Se espera obtener esta información sobre la posible interacción de estas dos proteínas con los experimentos próximos del laboratorio. De ser así, sería interesante realizar experimentos para esclarecer de qué manera interactúan (los dominios PAS de los SDC) entre sí, en particular RpuS/R y CrbS/R de *S. fredii*. De tal modo que los SDC no solo permitirían una percepción y respuesta rápida a los nutrientes, sino una complementación que incrementaría su posibilidad de sobrevivencia.

9. Conclusión

Se considera que los resultados obtenidos con DEL y RpuS-SF en comparación con WT brindan apoyo a la hipótesis que postulaba que el dominio PAS funciona en el relevo de señalización en el sistema de dos componentes SLC5/STAC permitiendo la autofosforilación del dominio quinasa al detectar una señal.

10. Bibliografía

- Aravind, L., & Ponting, C. P. (1997). The GAF domain: An evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(12), 458–459. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01148-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01148-1)
- Beier, D., & Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.005>
- Blake, C., Christensen, M. N., & Kovács, Á. T. (2021). Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 34(1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Borland, S., Prigent-Combaret, C., & Wisniewski-Dyé, F. 2016. (2016). Bacterial hybrid histidine kinases in plant–bacteria interactions. *Microbiology*, 162(10), 1715–1734. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000370>
- Buschiazzo, A., & Trajtenberg, F. (2019). Two-Component Sensing and Regulation: How Do Histidine Kinases Talk with Response Regulators at the Molecular Level? *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 507–528. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091018-054627>
- Capra, E. J., & Laub, M. T. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039>
- Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(6), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.09.010>
- Fairweather, I. (n.d.). *Cell Signalling in Prokaryotes and Lower Metazoa*. Springer.

- Ferris, H. U., Dunin-Horkawicz, S., Mondéjar, L. G., Hulko, M., Hantke, K., Martin, J., Schultz, J. E., Zeth, K., Lupas, A. N., & Coles, M. (2011). The Mechanisms of HAMP-Mediated Signaling in Transmembrane Receptors. *Structure*, *19*(3), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.01.006>
- Gao, M., Bengel, A., Wu, T.-J., & Javier, R. (2019). Use of Plasmid pVMG to Make Transcriptional β -Glucuronidase Reporter Gene Fusions in the Rhizobium Genome for Monitoring the Expression of Rhizobial Genes In Vivo. *Biological Procedures Online*, *21*, 8. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0096-y>
- Gao, R., Bouillet, S., & Stock, A. M. (2019). Structural Basis of Response Regulator Function. *Annual Review of Microbiology*, *73*, 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115931>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009a). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Gao, R., & Stock, A. M. (2009b). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., & Utsumi, R. (2010). Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.008>

- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2000). The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *40*(1), 519–561. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519>
- Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annual Review of Microbiology*, *65*, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-121809-151631>
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J. U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J. E., Lupas, A. N., & Coles, M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, *126*(5), 929–940. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.058>
- Ishii, E., & Eguchi, Y. (2021). Diversity in Sensing and Signaling of Bacterial Sensor Histidine Kinases. *Biomolecules*, *11*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/biom11101524>
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M., & Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0055-7>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, *6*(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M., & Farrand, S. K. (2008). Broad-Host-Range Expression Vectors with Tightly Regulated Promoters and Their Use To Examine the Influence of TraR and TraM Expression on Ti Plasmid Quorum Sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(16), 5053–5062. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-08>

- Kim, J.-R., & Cho, K.-H. (2007). The multi-step phosphorelay mechanism of unorthodox two-component systems in *E. Coli* realizes ultrasensitivity to stimuli while maintaining robustness to noises. *Computational Biology and Chemistry*, *30*, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2006.09.004>
- Korycinski, M., Albrecht, R., Ursinus, A., Hartmann, M. D., Coles, M., Martin, J., Dunin-Horkawicz, S., & Lupas, A. N. (2015). STAC—A New Domain Associated with Transmembrane Solute Transport and Two-Component Signal Transduction Systems. *Journal of Molecular Biology*, *427*(20), 3327–3339. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.08.017>
- Kumar, N., Srivastava, P., Vishwakarma, K., Kumar, R., Kuppala, H., Maheshwari, S. K., & Vats, S. (2020). The Rhizobium–Plant Symbiosis: State of the Art. In A. Varma, S. Tripathi, & R. Prasad (Eds.), *Plant Microbe Symbiosis* (pp. 1–20). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36248-5_1
- Las figuras fueron creadas con BioRender.com
- Laub, M. T., & Goulian, M. (2007). Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annual Review of Genetics*, *41*(1), 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>
- Loh, J., & Stacey, G. (2003). Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: A Unique Integration of Global Regulatory Circuits. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.10-17.2003>
- Maçik, M., Gryta, A., & Fraç, M. (2020). Chapter Two - Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances*

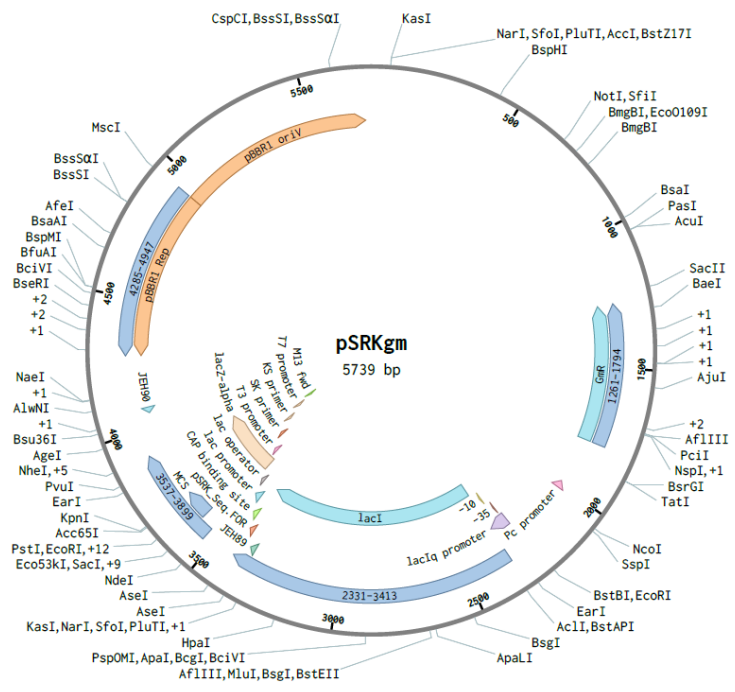
- in Agronomy* (Vol. 162, pp. 31–87). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.02.001>
- Margulis, L., & Schwartz, K. V. (1988). *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*. W.H. Freeman.
- Mendoza, D., Aguilar, P., Hernandez-Arriaga, A. M., Cybulski, L., & Erazo, A. (2001). Molecular basis of thermosensing: A two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 20(7), 1681–1691. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1681>
- Monteagudo-Cascales, E., García-Mauriño, S. M., Santero, E., & Canosa, I. (2019). Unraveling the role of the CbrA histidine kinase in the signal transduction of the CbrAB two-component system in *Pseudomonas putida*. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45554-9>
- Muzhingi, I., Prado, C., Sylla, M., Diehl, F. F., Nguyen, D. K., Servos, M. M., Flores Ramos, S., & Purdy, A. E. (n.d.). Modulation of CrbS-Dependent Activation of the Acetate Switch in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 200(23), e00380-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00380-18>
- Nishijyo, T., Haas, D., & Itoh, Y. (2001). The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 40(4), 917–931. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x>
- Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1429–1449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x>

- Papon, N., & Stock, A. M. (2019). What do archaeal and eukaryotic histidine kinases sense? *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-2145. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20094.1>
- Peng, X., Chen, L., Chen, L., Wang, B., Wang, Y., & Zhan, X. (2021). Chimeric antigen receptor-natural killer cells: Novel insight into immunotherapy for solid tumors (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(4), 1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9771>
- Ramos, A. L., Aquino, M., García, G., Gaspar, M., de la Cruz, C., Saavedra-Flores, A., Brom, S., Cervantes-Rivera, R., Galindo-Sánchez, C. E., Hernandez, R., Puhar, A., Lupas, A. N., & Sepulveda, E. (2022a). RpuS/R Is a Novel Two-Component Signal Transduction System That Regulates the Expression of the Pyruvate Symporter MctP in *Sinorhizobium fredii* NGR234. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.871077>
- Ramos, A. L., Aquino, M., García, G., Gaspar, M., de la Cruz, C., Saavedra-Flores, A., Brom, S., Cervantes-Rivera, R., Galindo-Sánchez, C. E., Hernandez, R., Puhar, A., Lupas, A. N., & Sepulveda, E. (2022b). RpuS/R Is a Novel Two-Component Signal Transduction System That Regulates the Expression of the Pyruvate Symporter MctP in *Sinorhizobium fredii* NGR234. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.871077>
- Saranraj, P., Sivasakthivelan, P., Al-Tawaha, A. R. M., Sudha, A., Al-Tawaha, A. R., Sirajuddin, S. N., & Hastang. (2021). Diversity and evolution of Bradyrhizobium communities relating

- to Soybean cultivation: A review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 788(1), 012208. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012208>
- Sepulveda, E., & Lupas, A. N. (2017). Characterization of the CrbS/R Two-Component System in *Pseudomonas fluorescens* Reveals a New Set of Genes under Its Control and a DNA Motif Required for CrbR-Mediated Transcriptional Activation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02287>
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: A review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 63. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02839-w>
- Silby, M. W., Cerdeño-Tárraga, A. M., Vernikos, G. S., Giddens, S. R., Jackson, R. W., Preston, G. M., Zhang, X.-X., Moon, C. D., Gehrig, S. M., Godfrey, S. A., Knight, C. G., Malone, J. G., Robinson, Z., Spiers, A. J., Harris, S., Challis, G. L., Yaxley, A. M., Harris, D., Seeger, K., ... Thomson, N. R. (2009). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology*, 10(5), R51. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r51>
- Stanley, J., Dowling, D. N., & Broughton, W. J. (1988). Cloning of hemA from *Rhizobium* sp. NGR234 and symbiotic phenotype of a gene-directed mutant in diverse legume genera. *Molecular and General Genetics MGG*, 215(1), 32–37. <https://doi.org/10.1007/BF00331299>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>

- Stuffle, E. C., Johnson, M. S., & Watts, K. J. (2021). PAS domains in bacterial signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 61, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.01.004>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Suva, M., Sureja, V., & Kheni, D. (2016). Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. In *Journal of Current Research in Scientific Medicine* (Vol. 2, Issue 2, pp. 65–72). Wolters Kluwer Medknow Publications.
- Taylor, B. L., & Zhulin, I. B. (1999). PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(2), 479–506. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.479-506.1999>
- Tiwari, S., Jamal, S. B., Hassan, S. S., Carvalho, P. V. S. D., Almeida, S., Barh, D., Ghosh, P., Silva, A., Castro, T. L. P., & Azevedo, V. (2017). Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01878>
- Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., & Gilles-Gonzalez, M. A. (2001). Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Biology*, 308(3), 449–455. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4591>
- Valentini, M., García-Mauriño, S. M., Pérez-Martínez, I., Santero, E., Canosa, I., & Lapouge, K. (2014). (n.d.). Hierarchical management of carbon sources is regulated similarly by the

- CbrA/B systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Microbiology*, *160*(10), 2243–2252. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078873-0>
- Vreede, J., Horst, M. A. van der, Hellingwerf, K. J., Crielaard, W., & Aalten, D. M. F. van. (2003). PAS Domains: COMMON STRUCTURE AND COMMON FLEXIBILITY *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 18434–18439. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301701200>
- Wang, S. (2016, April 18). *Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms*. https://www.researchgate.net/publication/300246141_Bacterial_Two-Component_Systems_Structures_and_Signaling_Mechanisms
- West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(6), 369–376. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01852-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01852-7)
- Wirtz, L., Eder, M., Schipper, K., Rohrer, S., & Jung, H. (2020). Transport and kinase activities of CbrA of *Pseudomonas putida* KT2440. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62337-9>
- Xie, Z., Ulrich, L. E., Zhulin, Igor. B., & Alexandre, G. (2010). PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2235–2240. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910055107>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, *428*(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>



pSRKgm. Vector de expresión de huésped amplio Gm^r (5738 pb).