

Emergence of an auxin sensing domain in plant-associated bacteria

JOSÉ A. GAVIRA^a, MIRIAM RICO-JIMÉNEZ^b, ÁLVARO ORTEGA^c, NATALIA V. PETUKHOVA^d, DMITRII S. BUG^e, ALBERT CASTELLVÍ^f, YURI B. POROZOV^g, IGOR B. ZHULIN^h, TINO KRELL^b, MIGUEL A. MATILLA^b

^aLaboratory of Crystallographic Studies, IACT (CSIC-UGR), Armilla, Spain.

^bDepartment of Biotechnology and Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain.

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology 'B' and Immunology, Faculty of Chemistry, University of Murcia, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Murcia, Spain.

^dBioinformatics Research Center, Pavlov First Saint Petersburg Medical State University, St. Petersburg, Russia.

^eMolecular Biology Institute of Barcelona, CSIC, Barcelona, Spain.

^fThe Center of bio- and chemoinformatics, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia.

^gDepartment of Microbiology, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.

✉ miguel.matilla@eez.csic.es

Las bacterias han desarrollado una amplia diversidad de sistemas de transducción de señales para adaptar su metabolismo y fisiología de manera eficiente a los continuos cambios que existen en sus correspondientes nichos ecológicos y hospedadores. En general, las proteínas receptoras de estos sistemas presentan dominios de unión a ligandos (DUL) que les permiten la detección específica de moléculas señal; tanto internas como externas a la bacteria. Este reconocimiento representa el estímulo molecular que genera la consecuente respuesta celular. Por ejemplo, a través de cambios en la expresión génica o en los niveles intracelulares de segundos mensajeros.

Nuestros estudios previos permitieron determinar que la biosíntesis de "andrimid", un antibiótico activo frente a fitopatógenos bacterianos de relevancia agrícola como *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Dickeya solani*, está controlada en el agente de biocontrol rizosférico *Serratia plymuthica* por el regulador transcripcional AdmX (Fig. 1A). AdmX presenta un dominio N-terminal de unión a ADN y un DUL en su extremo C-terminal. La realización de escrutinios de alto rendimiento permitió identificar que el DUL de AdmX (AdmX-DUL) reconoce a las auxinas ácido indolacético (AIA) y ácido indolpirúvico (AIP) – fitohormonas claves para el desarrollo y crecimiento vegetal. Sin embargo, únicamente el AIA reguló la producción de "andrimid" (Fig. 1B); sugiriendo que la actividad de AdmX podría estar modulada por la acción de agonistas (como el AIA) y antagonistas (como el AIP). Investigaciones previas, incluyendo las de nuestro grupo de investigación en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC; Granada) han identificado varios sistemas de transducción de señales que están controlados por agonistas

y antagonistas. Sin embargo, las características estructurales que determinan si un compuesto se comporta como agonista o antagonista se desconocen en gran medida. Para avanzar en este conocimiento, hemos resuelto la estructura tridimensional de AdmX-DUL en presencia de AIA y AIP (Fig. 1C). Además, se han analizado, desde una perspectiva multidisciplinar, los cambios conformacionales derivados del reconocimiento de ambas auxinas.

En primer lugar, se determinó que el AIA y el AIP compiten por su unión a AdmX-DUL. Además, se demostró que la unión de estas auxinas no altera el estado oligomérico de AdmX como tetrámero. Sin embargo, se estableció que los cambios conformacionales resultantes de la unión de AIA a AdmX-DUL se transmiten de manera diferencial al dominio de unión a ADN en comparación a cuando se reconoce AIP. La resolución de la estructura de AdmX-DUL en presencia de AIA y AIP permitió identificar el bolsillo de unión de auxinas (Fig. 1C), así como definir los aminoácidos que establecen las correspondientes interacciones con AIA y AIP. Aproximaciones basadas en dinámica molecular revelaron diferencias significativas en el modo de unión de AdmX-DUL a estas auxinas. Asimismo, la inspección de las correspondientes estructuras tridimensionales mostró evidentes cambios conformacionales en AdmX-DUL dependiendo de la auxina que presente unida. Por ejemplo, se encontró que la unión del AIP provoca un mayor grado de compactación de la estructura de AdmX-DUL.

Un análisis computacional permitió identificar ~1500 proteínas homólogas a AdmX. Sin embargo, únicamente el ~1% de estas proteínas, y codificadas en los genomas de fitobacterias pertenecientes a los géneros

Serratia, *Pantoea* y *Erwinia*, presentaron los residuos aminoácidos implicados en el reconocimiento de AIA y AIP. Asimismo, se demostró que proteínas homólogas carentes de estos residuos están privadas de la capacidad de reconocer auxinas. La realización de análisis filogenéticos, junto con el reducido número de homólogos de AdmX que presentan los residuos asociados al reconocimiento de auxinas (Fig. 1D), sugieren una historia evolutiva reciente de estos DULs; concretamente en enterobacterias asociadas a plantas.

En conclusión, los resultados derivados de este estudio apoyan que el reconocimiento de agonistas y antagonistas se dirime por pequeños cambios conformacionales en los correspondientes DULs; cambios que pueden transmitirse eficientemente al dominio de respuesta (ej. dominio de unión a ADN) para modular la respuesta final. Los DULs están sometidos a fuertes presiones selectivas y son dominios que evolucionan rápidamente. Nuestros datos concuerdan con un proceso evolutivo mediado por plantas que ha generado la aparición de proteínas receptoras que detectan específicamente auxinas. Se desconoce la función biológica del reconocimiento de antagonistas en bacterias, pero se ha sugerido que podrían funcionar como moléculas señal en la regulación de diversos procesos fisiológicos y metabólicos.

Este estudio, liderado por el Dr. Miguel A. Matilla, ha sido el fruto de una colaboración internacional entre investigadores de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada), Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-UGR, Granada), la Universidad de Murcia, la Universidad Estatal de Ohio (Estados Unidos) y la Universidad Médica Estatal Pavlov de San Petersburgo (Rusia).

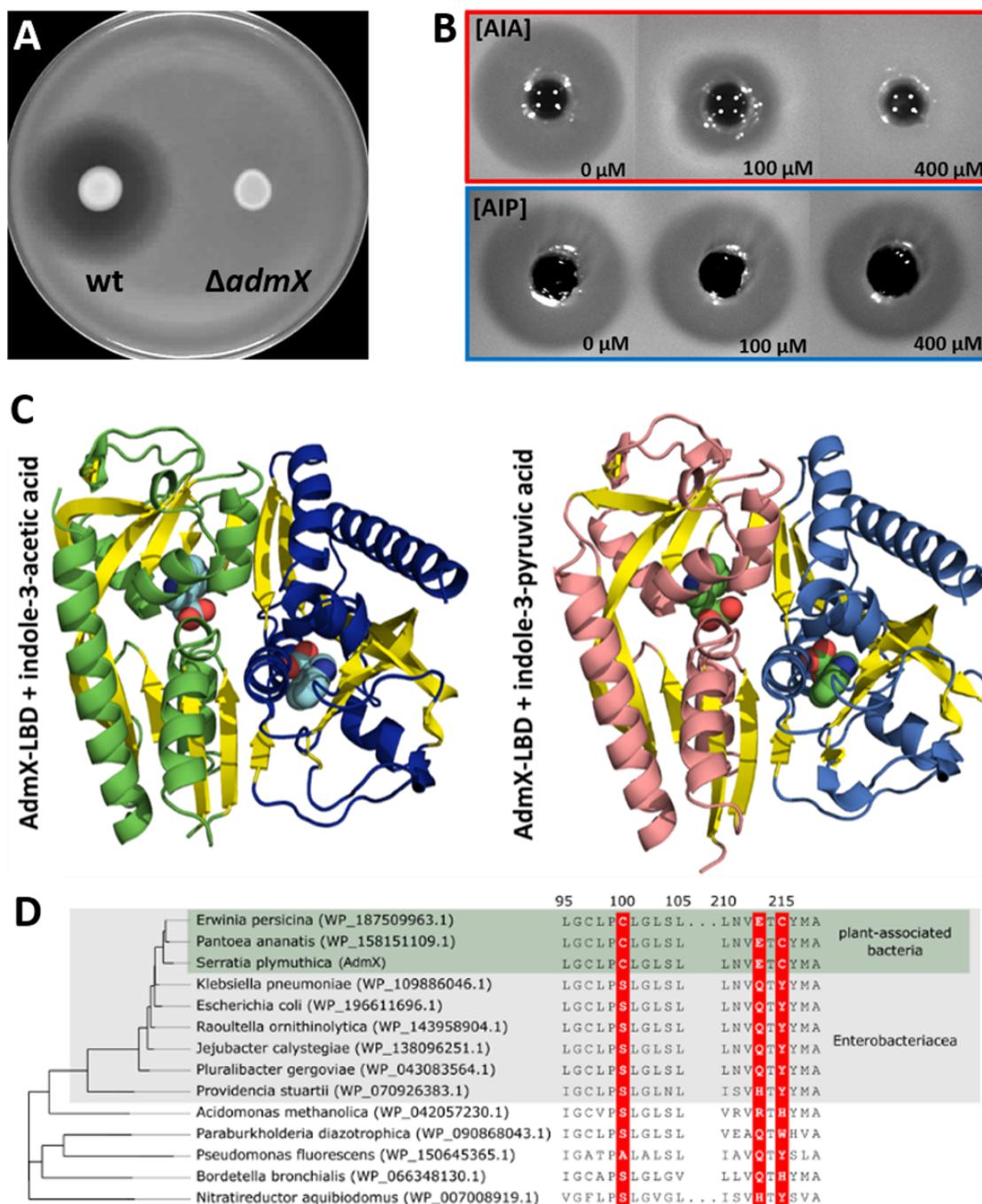


Figura 1. Papel del reconocimiento de auxinas por el regulador transcripcional AdmX en la modulación de la producción del antibiótico "andrimid" en el agente de biocontrol rizosférico *Serratia plymuthica*. A, AdmX es un regulador positivo de la producción de "andrimid". Se muestran las actividades antibacterianas frente a *Bacillus subtilis* de la cepa silvestre *S. plymuthica* A153 y de un mutante deficiente en admX. B, Papel de las auxinas ácido indolacético (AIA) y ácido indolpirúvico (AIP) en la producción de "andrimid" en A153. Se representan las actividades antibacterianas frente a *B. subtilis* de sobrenadantes de la cepa parental *S. plymuthica* A153 crecida en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de AIA y AIP (imagen izquierda) y AIP (imagen derecha) unidos. C, Estructura tridimensional del DUL de AdmX con AIA (imagen izquierda) y AIP (imagen derecha) unidos. D, Alineamiento de secuencia de distintas proteínas homólogas de AdmX. También se representa un árbol filogenético construido con el método "maximum likelihood". Los residuos C100 y C215, presentes en bacterias asociadas plantas, son clave para el reconocimiento de auxinas por AdmX.

José A. Gavira*, Miriam Rico-Jiménez, Álvaro Ortega, Natalia V. Petukhova, Dmitrii S. Bug, Albert Castellví, Yuri B. Porozov, Igor B. Zhulin, Tino Krell, Miguel A. Matilla*. (2023) Emergence of an auxin sensing domain in plant-associated bacteria. *mBio*. 14: e0336322. *Corresponding authors.