

Puebla, Pue. a 17 de noviembre 2021

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Alejandra Bernabé Allende**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Modelos estructurales de la enzima Fosfatasa y sus mutantes en *Escherichia coli*, involucrada en la producción de trehalosa y desecación en bacterias"

A nuestro juicio, la alumna **Alejandra Bernabé Allende** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"



D.C. Griselda Karina Guillén Navarro



D.C. Vianey Marín Cevada



D.C. José Antonio Muñive Hernández



D.C. Jesús Muñoz Rojas



D.C. Antonina Barr Rogelio



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS CICM

Posgrado en microbiología

Título: Modelos estructurales de la enzima Fosfatasa y sus mutantes en *Escherichia coli*, involucrada en la producción de trehalosa y desecación en bacterias.

Tesis presentada para obtener el grado de Maestría en Cs. Microbiológicas

Presenta: Q. F. B. Alejandra Bernabé Allende

Director de tesis: D. C. Verónica Quintero Hernández

Co-director de tesis: D. C. Víctor Rivelino Juárez González

Diciembre 2021

Agradecimientos

Primeramente, doy gracias a Dios por permitirme concluir el posgrado, por tener tan buena experiencia en el centro de investigación.

A mi madre Hilda Allende Flores por todo el apoyo brindado durante estos años de estudio, por todo el amor, y el cariño brindado, sin ello no habría podido culminar este posgrado. Y agradezco a mis hermanas, y a mi familia por todo el apoyo que me dieron.

Mi gratitud también a la D. C. Verónica Quintero Hernández y al D. C. Víctor Rivelino Juárez González por todo el apoyo, paciencia, enseñanzas y conocimiento que me dieron, por guiarme a cada paso en la realización de este proyecto.

Agradezco a la D. C. Griselda Karina Gillen navarro, al D. C. José Antonio Munive Hernández, y al D. C. Jesús Muñoz Rojas por todo el apoyo durante el posgrado y la escritura de esta tesis.

Agradezco a CONACyT por el apoyo en concepto de beca de maestría en el periodo de 2019-2021

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

INDICE	pág.
RESUMEN -----	5
ABSTRACT-----	6
Lista de Siglas y Abreviaturas-----	7
Lista de figuras-----	10
Lista de Tablas-----	14
1.- INTRODUCCIÓN -----	15
1.1- Bacterias benéficas-----	15
1.2- Estrés bacteriano-----	18
1.3- Estrés por desecación -----	18
1.4- Trehalosa-----	21
1.5- Alineamiento múltiple-----	23
1.6- Modelado de proteínas por SWISS- MODEL -----	25
ANTECEDENTES-----	27
JUSTIFICACIÓN-----	31
HIPÓTESIS-----	32
OBJETIVOS-----	33
METODOLOGÍA-----	35
RESULTADOS-----	42
DISCUSIÓN -----	64
CONCLUSIONES-----	74
PERSPECTIVAS -----	75
REFERENCIAS-----	76

RESUMEN

Las bacterias xerotolerantes o resistentes a la desecación intracelular, juegan un papel esencial en la rizosfera de las plantas., uno de los mecanismos para sobrevivir con éxito en ambientes extremos es la síntesis de trehalosa, un disacárido que evita la pérdida de agua de manera intracelular. La trehalosa 6 fosfato fosfatasa es una enzima involucrada en la síntesis de trehalosa, por lo cual en esta tesis se realizó el análisis de un alineamiento múltiple de secuencias de fosfatasas creado con Clustal Omega y el modelado por homología con SWISS-MODEL, generamos un modelo tridimensional de la fosfatasa de *Escherichia coli*, basándonos en las coordenadas atómicas, de la estructura de la fosfatasa de *Salmonella typhimurium*, depositada en el PDB, además de proponer mutaciones, que nos permitieron conocer más de la funcionalidad de los aminoácidos en el sitio activo de la enzima. Este conocimiento permitirá generar mutantes más activas que la enzima silvestre, que produzcan más trehalosa. Estas nuevas mutantes, serán clonadas en cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal que no son xerotolerantes, las cuales permitirán producir plantas de interés comercial.

ABSTRACT

Xerotolerant bacteria, which are resistant to intracellular desiccation, play an essential role in the rhizosphere of plants. One of their mechanisms, to success in extreme environments, is the synthesis of trehalose, a disaccharide that prevents intracellular water loss. Trehalose 6 phosphate phosphatase is an enzyme involved in the synthesis of trehalosa , therefore in this thesis we did a multiple sequence alignment with Clustal Omega using phosphatases sequences and the homology modeling with SWISS-MODEL, we generated a dimensional model of *Escherichia coli* phosphatase, based on the atomic coordinates, of the *Salmonella typhimurium* phosphatase structure, deposited in the PDB, in addition to proposing mutations that allowed us to learn more about the functionality of the amino acids in the active site of the enzyme. Using this knowledge will generate more active mutants than the wild enzyme, to produce more trehalose and these new mutants will be cloned in plant growth promoting bacterial strains that are not xerotolerant and will allow to produce plants of commercial interest.

Lista de Siglas y Abreviaturas

Å	Ångström (0.1 nm)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
°C	Grados Celsius
CHARMM-GUI	<i>Chemistry and HARvard Molecular Mechanics</i>
C-ter	Carboxilo terminal
Clustal	Programa de alineamiento múltiple de secuencias primarias
D	Acido glutámico
E	Acido aspártico
EPS	Ex tracellular P olymeric S ubstance
GROMACS	<i>GROningen Machine for Chemical Simulations</i>
ISR	Induced Systemic Resistance produced by rhizobacteria
I-TASSER	<i>Iterative Implementation of Threading ASSEmblly Refinement</i>
K	Lisina
K	Kelvin
L	Leucina

LPS	Lipopolisacárido
Mg ²⁺	Ion Magnesio
NAMD	<i>Not (just) Another Molecular Dynamics</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-ter	Amino terminal
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
Phyre2	<i>Protein Homology/analogY Recognition Engine V2.0</i>
Pi	Fósforo inorgánico
PyMOL	<i>Molecular Visualization System on an Open-Source Foundation V 2.4.1/2.4.2</i>
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation (raíz de la desviación cuadrática media)</i>
ROS	Reactive Oxygen Species
S	Serina
SWISS-MODEL	<i>Web-Based Integrated Service Dedicated to Protein Structure Homology Modelling</i>

TCA	Tricarboxilic Acid Cycle
TPS	Trehalosa fosfato sintasa
TPP	Trehalosa fosfato fosfatasa
3D	Estructura tridimensional

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de promoción de crecimiento de plantas por bacterias.

Figura 2. Mecanismos generales de tolerancia a desecación.

Figura 3. Formula de la trehalosa y la trehalosa hidratada

Figura 4. Mecanismo de síntesis de la trehalosa por medio de las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa 6 fosfato fosfatasa para generar una molécula de trehalosa.

Figura 5. Mecanismo de reacción de la trehalosa

Figura 6. *Escherichia coli* una bacteria Xerotolerante.

Figura 7. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para llevar el alineamiento múltiple con Clustal Omega y T-Coffee.

Figura 8. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL para generar un modelo tridimensional basado en homología de la fosfatasa de *E. coli*.

Figura 9. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI para generar un modelo tridimensional con campos de fuerza y los átomos de hidrogeno de la fosfatasa de *E. coli*.

La Figura 10. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar el modelo de la fosfatasa de *E. coli* en GROMACS.

Figura 11. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL para generar los modelos de las mutantes (D20N, D22E y K125R) de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*.

Figura 12. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI, para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R.

Figura 13. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R de trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la trehalosa fosfatasa de diferentes microorganismos y organismos, comparados con la secuencia de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, destacando la cobertura y el porcentaje de identidad realizados por T-Coffee.

Figura 15. Vista lateral de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* código de PDB (6UPD)

Figura 16. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL, para generar el modelo de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*.

Figura 17. Modelo tridimensional de la trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*. generado por SWISS-MODEL.

Figura 18. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI, para generar el modelo de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*, en su caja de agua con los iones de Mg^{2+} y Cl^{-} .

Figura 19. Modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, generados por CHARMM-GUI y visualizado por PyMOL.

Figura 20. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar el modelo final de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

Figura 21. Modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Figura 22. Alineamiento múltiple de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* con 44 fosfatasas de diferentes microorganismos y organismos realizados por Clustal y T-Coffee.

Figura 23. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL, para generar los modelos de las mutantes (D20N, D22E, K125R) de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*.

Figura 24. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI, para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R.

Figura 25. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R de trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

Figura 26. Acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de la mutante D20N del Modelo tridimensional de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Figura 27. Acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de la mutante D22E del Modelo tridimensional de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Figura 28. Acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de la mutante K125R del Modelo tridimensional de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Figura 29. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD, con el modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, generado por PyMOL.

Figura 30. Vista lateral de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* código de PDB (6UPD).

Figura 31. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD, con el modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* generado por PyMOL.

Figura 32. Superposición de la estructura de *Salmonella* código: 6UPD con el modelo de la mutante D20N a), y un acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de ambas enzimas, generado por PyMOL.

Figura 33. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD, con el modelo tridimensional de la mutante D22E de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, generado por PyMOL.

Figura 34. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD , con el modelo tridimensional de la mutante K125R de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* , generado por PyMOL.

Lista de tablas

Tabla 1. Muestra el número de ciclos utilizados, el potencial energético del modelo de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* analizados por GROMACS.

Tabla 2. Muestra el número de ciclos utilizados, el potencial energético de los modelos de las mutantes de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* analizados por GROMACS.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- Bacterias benéficas

Los microorganismos en la rizosfera (zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas y microorganismos del suelo), tienen un papel importante en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Yadav *et al.*, 2015), lo cual es clave para que la producción de cultivos sea exitosa y cumpla la creciente demanda mundial de alimentos. Por lo anterior, se ha tomado interés en utilizar bacterias promotoras de crecimiento o PGPB, por sus siglas en inglés (plant-growth-promoting bacteria), en la producción de cultivos. Actualmente se han generado y comercializado como inoculantes, demostrando que son capaces de reducir la cantidad de fertilizantes químicos y agroquímicos disminuyendo de manera simultánea la contaminación de suelos y mantos acuíferos (Rumjanek *et al.*, 1993; Guzmán *et al.*, 2012).

En México hay empresas que producen y comercializan biofertilizantes como: Biofábrica Siglo XXI y Biosustenta, estas empresas han aplicado las características metabólicas versátiles de las rizobacterias (fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas como auxinas y etileno) promotoras del crecimiento vegetal aisladas en América para la formulación de inoculantes bacterianos. (Molina-Romero *et al.*, 2015).

Las PGPB son capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano y se clasifican en 3 tipos: Tipo 1 pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos, bacterias simbióticas (Rhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium, Allorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Frankia, Azoarcus, Achromobacter, Burkholderia y Herbaspirillum), Tipo 2 se hospedan en estructuras internas de planta conocidas como bacterias endófitas (Azocarus sp. *Gluconacetobacter diazotrophicus*) y Tipo 3 se encuentran cerca del sistema radicular de las plantas también conocidas como bacterias de vida libre, entre las cuales son: *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus polymyxa*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*) (Kloepper *et al.*, 1989., Santoyo *et al.*, 2016., Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Diversas bacterias promotoras de crecimiento han sido empleadas para inocular semillas, tubérculos o raíz, siendo capaces de colonizar la raíz estimulando el crecimiento y rendimiento de cultivos (Changway *et al.*, 1989), demostrando el aumento de

nitrógeno, fósforo y niveles de algunos minerales que ponen a disponibilidad de la planta (Bashan y Holguín, 1997).

Los microorganismos promotores de crecimiento de plantas son definidos por 3 características **Figura 1:** Son capaces de colonizar la raíz o la rizosfera, sobreviven y se multiplican en el microhábitat asociado a la superficie de la raíz en competencia con otros microorganismos y finalmente, promueven el crecimiento de la planta. Las bacterias promotoras de crecimiento, pueden ser de vida libre o en asociación simbiótica con la raíz de la planta. Los mecanismos por los cuales promueven el crecimiento, son de manera directa al producir o cambiar las concentraciones de algunos reguladores de las plantas tales como: ácido indol acético (hormona vegetal), citosinas (bases nitrogenadas) y etileno (hormona en forma de gas producida de forma natural por todos los vegetales) (Arshad y Frankerberger, 1993), fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Boddey y Dobereiner, 1995) y de manera indirecta inhiben a los microorganismos patógenos, mediante la producción de sideróforos (agente quelante para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo) (Scher y Baker 1982) y al inducir el sistema de resistencia (ISR por sus siglas en inglés: Induced Systemic Resistance produced by rhizobacteria) en la planta (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

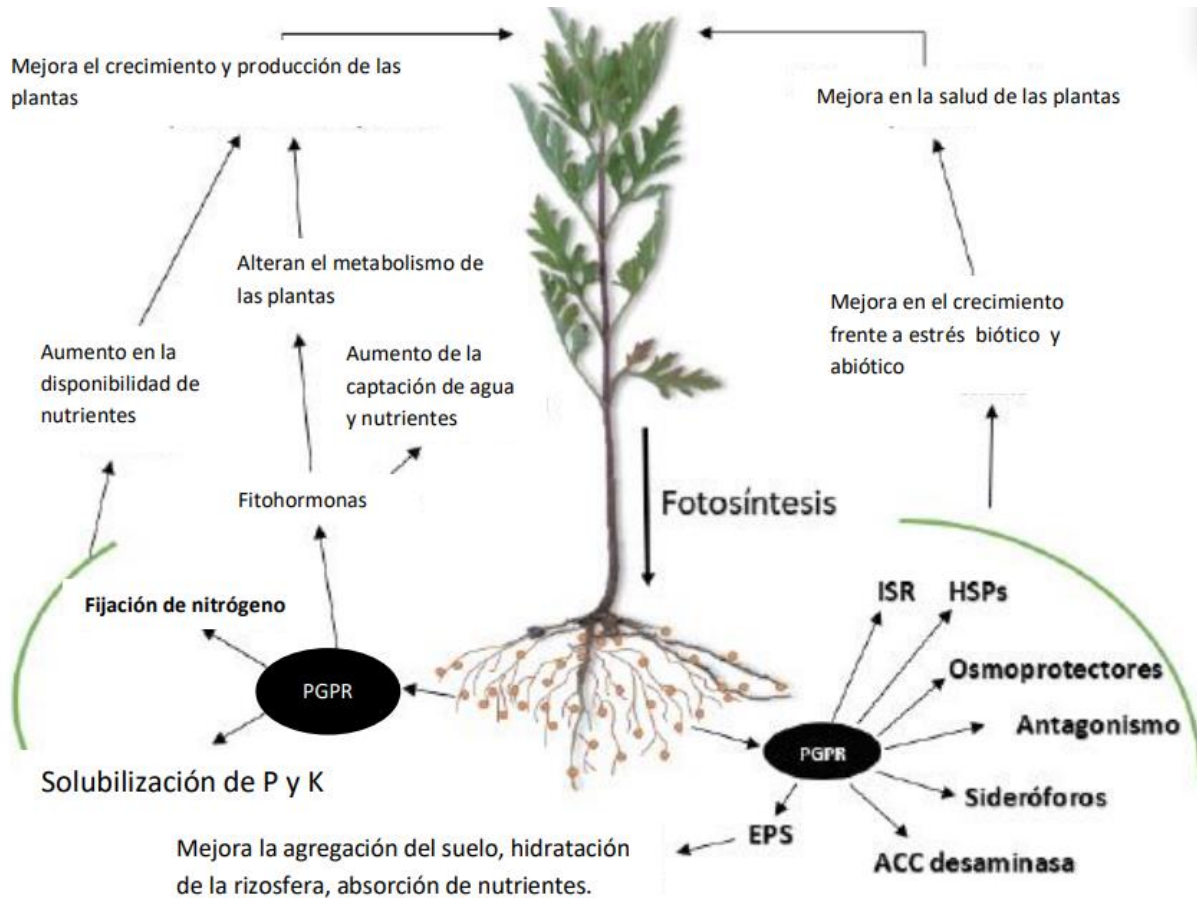


Figura 1. Mecanismos de promoción de crecimiento en plantas por bacterias.

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan Nitrógeno, pero solo algunas de ellas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento, la mayoría de estos microorganismos se encuentran interactuando con la rizosfera. Entre los organismos en la rizosfera, se tiene evidencia de que algunas especies de *Pseudomonas* incrementan la absorción de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, además de servir como biocontrol de hongos fitopatógenos y producir fitohormonas en la rizosfera, lo cual promueve el crecimiento en las plantas (Di Benedetto *et al.*, 2017; Efthimiadou *et al.*, 2020). La rizosfera también mejora la asimilación de algunos nutrientes: el fósforo en el suelo se puede encontrar como compuesto inorgánico en complejo con aluminio (Al^{3+}), hierro (Fe^{3+}), manganeso (Mn^{2+}) y calcio (Ca^{2+}), o como compuesto orgánico como nucleótidos, fosfoproteínas, fosfolípidos, en estas formas no están totalmente disponibles para la planta, pero estos pueden convertirse, por algunas rizobacterias, en fosfatos dibásicos y monobásicos,

que son formas asimilables para las raíces de las plantas; las principales especies activas en esta conversión pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Mycobacterium* (Alexander 1981, Todeschini *et al.*, 2018, Hollensteiner *et al.*, 2017, Pandey y Gupta, 2020).

Las bacterias que ejercen biocontrol, producen metabolitos secundarios que son excretados localmente y eliminan de forma natural a los fitopatógenos como hongos, e insectos (Bloemberg y Lugtenberg., 2001), entre las moléculas secretadas se encuentran el ácido fenazina-1-carboxílico, pioluteorina, pirrolnitrina y diacetilfloroglucinol (Couillerot *et al.*, 2013), entre las bacterias que realizan esta función destacan las del género *Burkholderia* (Tenorio Salgado *et al.*, 2013) y *Streptomyces venezuelae* (Morales-García *et al.*, 2001).

1.2- Estrés bacteriano

La supervivencia de las bacterias, está asociada a la capacidad que presentan para detectar y reaccionar a cambios en el medio ambiente., Cualquier perturbación en el medio ambiente, que reduce la tasa de crecimiento e impacte negativamente en la supervivencia del microorganismo se denomina estrés y genera cambios adaptativos transitorios, los cuales les permiten hacer frente a estas condiciones desfavorables como: escasez en nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo, cambios bruscos de temperatura, entre otros (Roquette *et al.*, 1998). Como parte de la defensa a estas condiciones la célula puede acumular compuestos para proteger macromoléculas y membranas (Kempf y Bremer, 1998).

1.3- Estrés por desecación

La desecación es la pérdida de agua en las células de manera intracelular. Una definición cuantitativa de la desecación total es la pérdida de agua hasta alcanzar 0.1 g de agua por cada gramo de masa seca, lo que genera que el metabolismo celular se detenga. Con base a esta definición se considera que existen dos tipos de desecación las cuales pueden ser total o parcial, en esta última el metabolismo de la célula no se detiene (Alpert, 2005).

La tolerancia a desecación se define como la habilidad de un organismo de soportar la eliminación de hasta el 95% de su agua y reanudar el metabolismo normal después de la rehidratación (Crowe *et al.*, 1992). La desecación impone una serie de tensiones como: hiperosmolaridad, hiperoxidación, mal plegamiento y agregación de proteínas (Franca *et al.*, 2005), estas tensiones tienen el potencial de dañar componentes esenciales como ADN (Ácido desoxirribonucleico), proteínas y membranas (Herrero *et al.*, 2009). Existen algunos factores implicados en la tolerancia a la desecación como modificaciones a lipopolisacáridos o LSP (componente mayoritario de carbohidratos y lípidos de las membranas bacterianas), formación de biofilm (matriz protectora compuesta por exopolisacárido, lípidos y DNA extracelular) (Chakrabortee *et al.*, 2007), se ha observado que la tolerancia a desecación de algunos organismos es promovida por la adición o síntesis de azúcares no reductores, como: trehalosa, sucrosa (Laura Abisaí Pazos-Rojas *et al.*, 2019), así como proteínas hidrofílicas (tienen afinidad por el agua como artemina, proteína Hps12 por sus siglas en inglés Heat shock protein 12) (Crowe *et al.*, 1992, Hibshman *et al.*, 2020), estas moléculas reemplazan el agua y estabilizan macromoléculas (García, 2011).

El mecanismo de tolerancia a la desecación **Figura 2**, muestra que en esta situación de estrés la pérdida de agua en las células tolerantes se equilibra debido a las interacciones reversibles con otras moléculas (Rebechi *et al.*, 2007). De esta manera las biomoléculas y estructuras están protegidas, conservando su conformación nativa después de la rehidratación (Wolkers *et al.*, 2000).

Una de las estrategias de supervivencia a la desecación, es la acumulación de azúcares no reductores como trehalosa (Clegg, 2001), estos azúcares tienen la función de proteger a las biomoléculas.

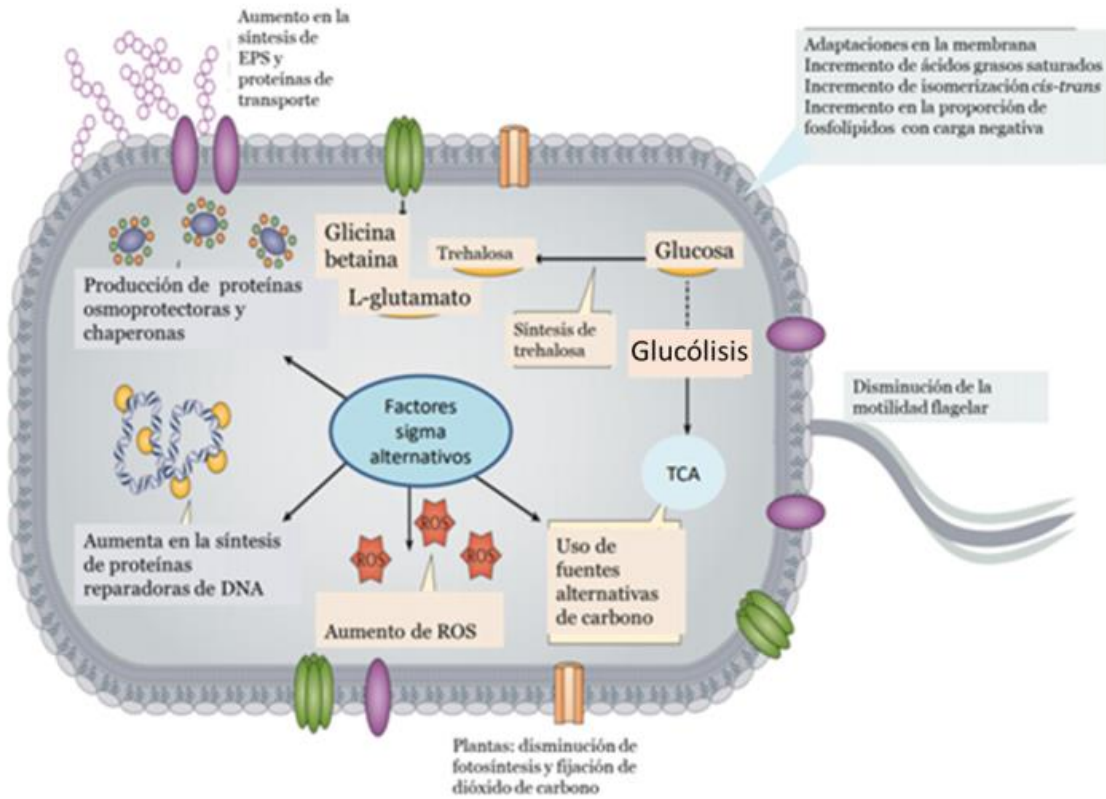


Figura 2. Mecanismos generales de tolerancia a desecación , modificado al idioma español de Lebré *et al.*, 2017.

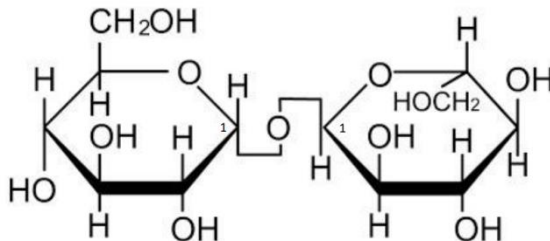
Por otra parte la variabilidad en el desempeño de las bacterias PGPB, se debe a factores ambientales que afectan su crecimiento como: las características y composición del suelo, la flora microbiana. Uno de los factores que más limita el efecto de las bacterias PGPB, es la disponibilidad de agua en el ambiente, si el agua es escasa, los microorganismos pueden morir en los primeros momentos de la interacción con las plantas (Vilchez y Manzanera, 2011). El contenido de agua en el suelo, está asociado con la disponibilidad de nutrientes y con la aireación del suelo (Griffin 1981), variaciones ante cambios de estaciones y condiciones

climáticas (Van Gestel *et al*, 1993), algunos estudios de suelo indican que la humedad de suelo óptima, para procesos microbianos aerobios se encuentra entre 50-60% de humedad (Linn y Doran, 1984) y el suelo por debajo de estas condiciones, limita los procesos microbianos (Papendick y Campbell, 1981).

1.4- Trehalosa

La trehalosa, es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1->1) involucrando los grupos OH de los dos carbonos anoméricos **Figura 3**.

Figura 3. Formula de la trehalosa, enlace α (1-1).



Este disacárido, es producido por células procariotas (sin núcleo) y eucariotas (con núcleo), su producción esta frecuentemente asociada a estrés fisiológico como shock osmótico, en donde la trehalosa forma una matriz anti-deshidratación que tiene propiedades estabilizantes (Singer *et al*, 1998); se ha sugerido que la trehalosa puede proteger macromoléculas biológicas y evitar su destrucción (Tapia y Koshland, 2014, Tapia *et al.*, 2015). Existen 3 vías en que ciertos organismos pueden sintetizar trehalosa *in vivo*: 1) Por medio de la enzima trehalosa sintasa que convierte maltosa a trehalosa por transglucosilación, 2) Por medio de la enzima trehalosa fosforilasa que sintetiza trehalosa a partir de una molécula de β -glucosa 1- fosfato y una molécula de glucosa (Kizawa *et al* 1995) y 3) La vía más común de la trehalosa sintasa y trehalosa fosfatasa **Figura 4**.

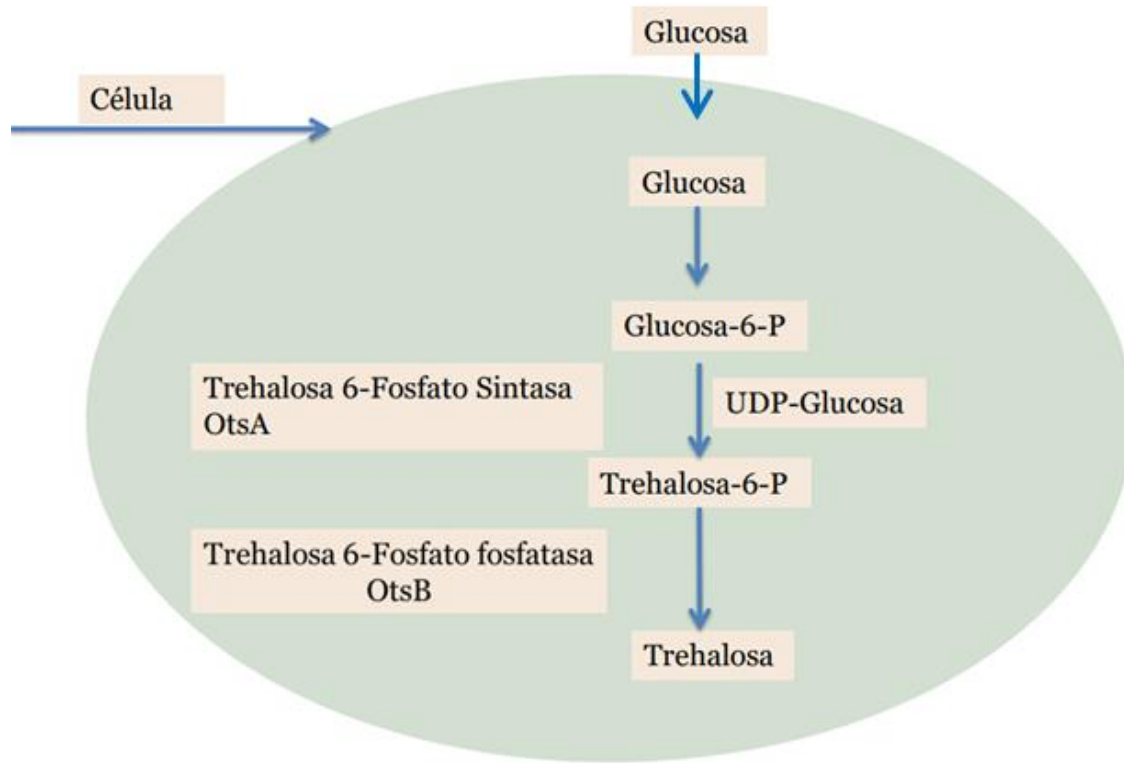


Figura 4. Mecanismo de síntesis de la trehalosa por medio de las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa 6 fosfato fosfatasa para generar una molécula de trehalosa.

La trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP), la sintasa toma la UDP-glucosa y la une a la molécula de glucosa-6-fosfato, formando trehalosa-6-fosfato (Tre6P), este sustrato lo toma la fosfatasa y lo hidroliza en trehalosa y Pi **Figura 5** (Kaasen *et al*, 1992).

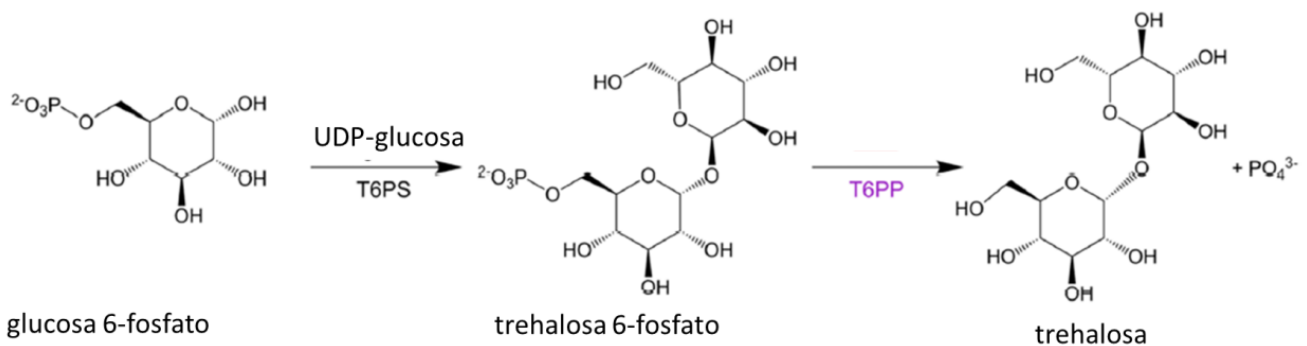


Figura 5. Mecanismo de reacción de la trehalosa, imagen traducida al español de Harvey *et al.*, 2020.

Los genes que codifican para la biosíntesis de trehalosa están distribuidos en diferentes organismos en la naturaleza (Kosar *et al.*, 2019; Sethi *et al.*, 2018; Elbein, 1974). Particularmente en *Escherichia coli* (*E. coli*) **Figura 6**.

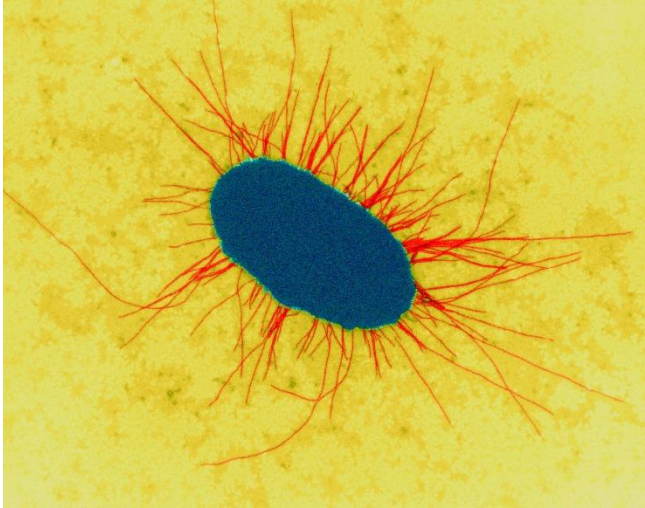


Figura 6. *Escherichia coli* es una bacteria Xerotolerante, imagen tomada de Dennis Kunkel Microscopy, Science Photo Library.

El operón (grupo de genes co-regulados con funciones relacionadas) que codifica para la síntesis de trehalosa (*otsBA*), es inducido por varios factores: shock osmótico (Giarver *et al.*, 1988), calor extremo (De Virgilio *et al.*, 1994), frío extremo (Kandror *et al.*, 2002), al entrar en fase estacionaria (etapa en la que cesa el crecimiento pero la célula permanece metabólicamente activa) (Hengge-Aronis *et al.*, 1991) y por la desecación (Van, 1989).

El operón *otsBA* de *E. coli* ha sido utilizado por la ingeniería genética, para incrementar la tolerancia a estrés en plantas (Garg *et al.*, 2002).

1.5- Alineamiento múltiple

La bioinformática (aplicación de herramientas computacionales para el análisis de gran cantidad y diversidad de datos biológicos), ha mostrado un gran avance, principalmente desde que el área de la genómica (estudio de los genomas de diferentes microorganismos y organismos) creció tanto que generó una cantidad de datos biológicos que no podrían ser analizados de forma manual. La manipulación rápida y adecuada de estos datos ha sido posible gracias al

desarrollo y aplicación de software (soporte lógico de un sistema informático) de comparación y análisis de datos de una manera más rápida, además han sido gratuitos y al igual que el acceso a la información almacenada en las bases de datos virtuales (Nute *et al.*, 2019).

Con las secuencias obtenidas experimentalmente es posible realizar alineamientos múltiples de secuencias (MSA), para ello se requieren: las secuencias primarias de las proteínas. En este trabajo se utilizaron las enzimas fosfatasas, las cuales fueron empalmadas por los programas, desde la región amino terminal (N-ter) hasta su extremo carboxilo terminal (C-ter) (Bawono *et al.*, 2017; Blanco y Blanco, 2017). El MSA (Alineamiento múltiple de secuencias) tiene un papel importante en la investigación biológica, entre sus aplicaciones incluye la detección de homología (similitud de organismos debido a un ancestro común) (Yong Wang *et al.*, 2009), para predicción de estructura y función (Cuff y Barton, 2000), la identificación de dominios (unidad básica de la proteína que puede plegarse por sí misma) y familias de proteínas (grupo de proteínas relacionadas evolutivamente) (George y Heringa, 2002; Yan Wang *et al.*, 2021).

Existen diferentes métodos para el MSA como: PRALINE (por sus siglas en inglés PRofile ALLgNEMENT) es un servidor para MSA capaz de integrar información de búsquedas de homología en bases de datos para generar alineamiento múltiple extendido (Simossis y Heringa, 2005); MUSCLE es un programa informático para crear múltiples alineaciones de secuencias de proteínas, el algoritmo incluye la estimación de distancia rápida, alineación progresiva y refinamiento (Edgar, 2004); T-Coffee, es un programa de alineación de múltiples secuencias, la característica principal es que te permite combinar los resultados obtenidos con varios métodos de alineación, es un programa que puede manejar secuencias de proteínas y DNA, y también está la opción de descargarlo (Bawono *et al.*, 2017). Estas herramientas bioinformáticas, y la gran capacidad de almacenamiento de información en bases de datos virtuales han permitido avances en la tecnología de la información, además de que estas bases de datos, se actualizan continuamente con nuevas secuencias genómicas disponibles universalmente (Villas-Boas *et al.*, 2020). En el contexto actual de la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2, se usó el análisis de secuencias múltiples para reconstruir el árbol filogenético del SARS-CoV-2, empleando genomas completos de coronavirus y de esta manera representar su relación evolutiva (Singh *et al.*, 2020), con todo lo mencionado con anterioridad,

lograron comprender el origen del virus, a partir de un análisis comparativo de datos genómicos del nuevo virus con otros de la misma familia, sugiriendo así su origen por selección natural (proceso a través del cual los organismos mejor adaptados desplazan a los menos adaptados).

1.6- Modelado de proteínas por Swiss Model (*Web-Based Integrated Service Dedicated to Protein Structure Homology Modelling*).

La estructura tridimensional de las proteínas proporciona información valiosa sobre su función, en general esta es esencial para una comprensión integral de los sistemas biológicos. Debido al progreso continuo de las metodologías para determinar las estructuras 3D de las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.) a nivel atómico como: la Difracción de rayos X sobre cristales de proteínas, (Günther *et al.*, 2021; Huxford, 2013; Su *et al.*, 2016; Vénien-Bryan *et al.*, 2017), resonancia magnética nuclear o RMN (el análisis tridimensional de las proteínas en solución usando la información de los núcleos de los átomos sometidos a campos magnéticos) (Ishima & Torchia, 2000) y Crio-Microscopía Electrónica o CRYO-EM (tipo de microscopía electrónica que determina la estructura tridimensional de las proteínas a nivel atómico a temperaturas criogénicas) (Binshtein & Ohi, 2015). Toda esta gran cantidad de información estructural, generada por las técnicas mencionadas con anterioridad, es depositada en el banco de datos de proteínas o PDB (*Protein Data Bank*) (Berman *et al.*, 2002) que hasta hoy en día tiene 176247 estructuras depositadas.

Debido al gran desarrollo del poder de las computadoras, conforme pasa el tiempo y la creciente facilidad de acceso a bases de datos como el PDB, surge el modelado estructural como otra valiosa fuente de información, permitiendo la generación de modelos estructurales a nivel atómico, de secuencias de aminoácidos de proteínas de las cuales no existe una estructura tridimensional en el PDB. Los investigadores de biología estructural, son capaces de generar modelos tridimensionales, a partir de la secuencia primaria de aminoácidos, generando nuevos modelos basados en homología, utilizando la información de las estructuras depositadas en el PDB, que tengan un porcentaje de identidad en secuencia arriba de 30%. El programa predictor de estructuras de acceso libre SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018, Benkert *et al.*, 2011), pionero en el campo del modelado automatizado desde hace más de 25 años, tiene una biblioteca de plantillas o plantillas, que se actualiza continuamente de acuerdo a las

estructuras depositadas en el PDB, además, proporciona estimaciones de calidad en varias etapas del proceso de modelado, una vez que se obtiene el modelo, la función de QMEAN evalúa su calidad del modelo a escala global y local (*Benkert et al*, 2011). SWISS-MODEL es uno de los modeladores, más utilizados actualmente por los científicos estructurales, para la generación de modelos tridimensionales basados por homología, presentando ventajas como: generación de modelos tridimensionales en poco tiempo, coloca los puentes disulfuro (si tiene la proteína en cuestión), permite ver las estructuras cuaternarias y muestra gráficos de alta calidad a diferencia de otros modeladores como I-TASSER (*Iterative Implementation of Threading ASSEmbly Refinement*) (Zheng *et al.*, 2019) y Phyre2 (*Protein Homology/analogy Recognition Engine V2.0*) (Kelley *et al.*, 2015). El modelo generado por SWISS MODEL, puede ser utilizado por el programa CHARMM-GUI (*Chemistry and HARvard Molecular Mechanics*) para: asignar los parámetros de un campo de fuerza a todos los átomos de la proteína en una caja de agua virtual, tomando en cuenta el Buffer y pH para simular las condiciones en las que se encontraría la proteína globular en solución (S. Kim *et al.*, 2017).

Los archivos de salida de CHARMM-GUI son tomados por el último programa de este proceso, llamado GROMACS (*GROningen Machine for Chemical Simulations*), el cual, mediante ciclos de simulación, quita los choques estéricos que pudieran presentar algunos átomos en los nuevos modelos, llevando a la estructura a un mínimo energético de la proteína cercano a la estructura nativa que es la biológicamente funcional (Pronk *et al.*, 2013). Finalmente, los modelos generados, son visualizados en programas como: PyMOL (sistema de visualización molecular), analizando las regiones estructurales de interés (Mooers, 2020; Cheng y Li, 2020).

ANTECEDENTES

Debido a las características de las bacterias PGPB, se han realizado varios esfuerzos para poder utilizar estos microorganismos como biofertilizantes, siendo esta una de las alternativas más prometedoras para la agricultura, cada año se incrementa la utilización de estos, a menudo con el fin de reducir la utilización de productos químicos en la agricultura (Malusá y Vassilev 2014).

Los biofertilizantes a base de PGPB, no han sido ampliamente aceptados por los agricultores, debido a que frecuentemente es difícil reproducir sus efectos benéficos en el campo. Es evidente que, si un inoculante microbiano no se produce en su fórmula (formulaciones con uno o más microorganismos contenidos es un acarreador) o aplica adecuadamente, los beneficios del biofertilizante no pueden ser adquiridos (Vassilev *et al.*, 2015).

Inoculante multiespecies o INOCREP.

En el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, perteneciente al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), se cuenta actualmente con un inoculante multiespecies, denominado INOCREP el cual contiene 6 cepas bacterianas diferentes: *Azospirillum brasilense* Sp7, *Burkholderia unamae* MTI641, *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF 178, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* PAI 5 y *Bradyrhizobium* sp. MS22, con capacidad de promoción de crecimiento para plantas de interés agrícola y/o biorremediación. La formulación promueve el crecimiento de plantas de maíz, papa, fresa, maní entre otras de interés agrícola. Las bacterias de la presente formulación se adhieren y colonizan las plantas de forma adecuada mediante sus propias capacidades.

A pesar de que existen diversos reportes sobre las ventajas de usar PGPB en cultivos, la aplicación de estos microorganismos aún está poco explorada.

Las formulaciones de PGPB no siempre tiene el efecto deseado (Dobbelaere *et al*, 2001), la capacidad de los microorganismos en campos de cultivo, depende de diferentes factores que limitan su efectividad por ejemplo: el tipo de cultivo, condiciones climáticas, variedad de cultivos,

el genotipo de la bacteria, la efectividad del aislado de bacteria, la inoculación apropiada del inoculante (Bashan *et al*, 2014).

El diseño de la formulación, es complejo ya que las bacterias miembros de esta mezcla deben coexistir sin ningún antagonismo (capacidad de un microorganismo para inhibir el desarrollo de otros microorganismos de su comunidad) entre ellas, además cada bacteria elegida debe aportar diferentes habilidades, para promover el crecimiento de plantas seguido por biorremediación (proceso biotecnológico que utiliza microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para recuperar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural).

Otra característica importante de un inoculante multiespecies es que la mezcla de bacterias da mejores resultados que los que resultan de solo utilizar una bacteria en forma individual o como inoculante monoespecie (formulación con una sola especie de microorganismo).

***Pseudomonas putida* KT2440**

Bacterias del género *Pseudomonas*, han sido aisladas de diferentes hábitats incluyendo diferentes tipos de suelo, agua, hojas, raíces de plantas, piel y tejidos de algunos animales (Galli *et al*, 1992).

La capacidad de *Pseudomonas*, de colonizar una amplia variedad de ambientes reside, no solo en su capacidad de adherirse a partículas sólidas (Duque *et al*, 1993) sino también a su movilidad y versatilidad metabólica, ya que utiliza compuestos de carbono, azufre y fosforo (Leisinger, 1983).

Pseudomonas putida KT2440, es usada como modelo en estudios de biodegradación, su versatilidad metabólica ha sido crucial para que KT2440 se adapte a múltiples nichos (condiciones ambientales, físicas y bióticas, en las cuales una especie, puede vivir y perpetuarse exitosamente) (Martínez *et al* 2002), algunos estudios indican que KT2440 es eficiente en la colonización de la rizosfera de plantas de interés agronómico (Molina *et al*, 2000). Sin embargo, a pesar de estas cualidades, su actividad se ve afectada por factores limitantes como el pH, salinidad, disposición de nutrientes y de agua (Pazos-Rojas *et al.*, 2007).

Se han estudiado adaptaciones bioquímicas durante la deshidratación en organismos anhidrobióticos, los cuales son capaces de sobrevivir a periodos de desecación mediante un fenómeno conocido como anhidrobiosis (Gusev *et al.*, 2010). La anhidrobiosis o tolerancia a la desecación, se define generalmente como la capacidad que posee un organismo, para perder agua intracelular hasta llegar a un equilibrio con un ambiente seco, y posteriormente al ser hidratado recuperar su estado fisiológico normal (Alpert, 2005), se ha dirigido especial atención al papel que juegan los azúcares no reductores principalmente el disacárido trehalosa.

Por ejemplo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, al acercarse a la fase estacionaria, empieza a acumular trehalosa, que se correlaciona con la habilidad de tolerar la desecación, durante la fase logarítmica, las levaduras que contienen baja cantidad de trehalosa muestran poca supervivencia frente a la desecación, durante la fase logarítmica se puede inducir a la células a sintetizar trehalosa, por medio de choque térmico y se vuelven resistentes a los efectos dañinos durante la desecación.

Por otra parte, las mutantes que perdieron la habilidad de sintetizar o exportar trehalosa, no son resistentes a la desecación, esto sugiere que tanto la trehalosa intracelular como extracelular son requeridas.

In vitro se sabe que trehalosa, es necesaria para prevenir o disminuir el daño a moléculas biológicas o membranas durante la desecación, se ha propuesto que la trehalosa y moléculas similares reemplazan el agua estructural o que los azúcares forman “vidrio orgánico” que encapsula moléculas, minimiza el movimiento de moléculas y por tanto inhibe la fusión de membranas, la desnaturalización de proteínas, la difusión de radicales libres, se sabe que bajo condiciones hiperosmóticas muchas bacterias tienden a acumular solutos compatibles incluyendo la trehalosa.

Esta característica, podría ser explotada para mejorar la tolerancia a la desecación, se sabe que para que las cianobacterias (organismo procarionte que realiza la fotosíntesis oxigenada) resistan desecación extrema, producen solutos a nivel intracelular y una gran cantidad de exopolisacárido (polisacáridos microbianos secretados en el ambiente circundante) (Demoulin *et al.*, 2019), la mayoría de las cianobacterias desérticas producen material extracelular, una característica que constituye bases para la tolerancia a condiciones ambientales extremas, se

sabe que cianobacterias acumulan trehalosa (disacárido no reductor formado por 2 moléculas de glucosa) no solo en el citoplasma sino también en la matriz extracelular como mecanismo de tolerancia a la desecación (Sakamoto *et al*, 2009).

En un estudio realizado en *Escherichia coli*, se demostró que al modificar un grupo de enzimas relacionadas con la producción de trehalosa por evolución dirigida, la modificación al azar por PCR propensa a error de los genes que conforman el operón de las proteínas sintetasa y fosfatasa la cual fue, seguida de una selección para incrementar la producción de trehalosa (Xiaonduo *et al*, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Debido al creciente interés por reducir el uso de productos agroquímicos se han buscado nuevas alternativas para la agricultura, una de ellas es el uso de bacterias promotoras de crecimiento, se sabe que estas aumentan la producción de las plantas cultivadas y algunas actúan como biorremediadores. La desventaja en el uso de estas bacterias es que cuando el agua disminuye algunas especies bacterianas mueren, es por ello que resulta necesario desarrollar una estrategia para que las PGPB sean viables y eficientes en un mundo cada vez más afectado por sequías. Algunas bacterias son más resistentes a la desecación y la trehalosa es un disacárido que evita la pérdida de agua de manera intracelular. La trehalosa 6 fosfato fosfatasa es una enzima involucrada en la síntesis de trehalosa, por lo cual en este trabajo generamos modelos tridimensionales de la enzima Trehalosa fosfatasa de la bacteria *Escherichia coli*, un microorganismo xerotolerantes, y sus mutantes por medio del análisis de alineamiento de secuencias múltiple a partir de Clustal Omega y modelado por homología por SWISS-MODEL. Basados en el análisis de estructuras depositadas en el banco de datos o PDB, podremos proponer y analizar mutantes que pudieran mejorar las propiedades cinéticas de la enzima en cuestión. Con todo lo anterior, en un futuro se clonarán los genes de esta fosfatasa en bacterias que no son xerotolerantes, las cuales son importantes en la rizosfera.

Hipótesis

Podremos generar modelos por homología de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, basados en estructuras reportadas en el PDB, aunado al análisis de múltiples secuencias de aminoácidos, nos permitirá generar mutantes *in silico* en el sitio activo de la enzima para hacer su análisis estructural.

Objetivos

Objetivo general

Realizar por SWISS MODEL modelos por homología de la enzima trehalosa fosfatasa y mutantes, involucrada en la producción de trehalosa y la desecación en bacterias.

Objetivos particulares

1. Hacer un modelo por homología de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* por medio del servidor SWISS-MODEL.
2. Minimizar la energía de los modelos obtenidos con los programas CHARMM-GUI y GROMACS.
3. Analizar el modelo generado por CHARMM-GUI y GROMACS por medio del visualizador PyMOL.
4. Buscar los genes de la trehalosa fosfatasa en diferentes microorganismos y organismos.
5. Realizar alineamientos múltiples de secuencias para evaluar mutaciones en aminoácidos del sitio activo de la enzima en cada una de las secuencias seleccionadas.
 6. Realizar modelos por homología de las mutaciones seleccionadas durante el alineamiento múltiple por medio del servidor SWISS MODEL.
 7. Minimizar la energía de los modelos obtenidos por medio de los programas CHARMM-GUI y GROMACS.
 8. Analizar los modelos obtenidos con CHARMM-GUI y GROMACS por medio del visualizador PyMOL.

9. Dar una explicación estructural de los diferentes modelos de la fosfatasa de *E. coli* y sus mutantes en el sitio activo de la enzima analizadas por GROMACS, con las estructuras seleccionadas del PDB.

METODOLOGÍA

Búsqueda de secuencias completas de trehalosa fosfatasa

En esta sección se describen las estrategias computacionales utilizadas para llevar a cabo esta investigación. Comenzamos obteniendo la secuencia de aminoácidos de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con numero de acceso WP_000114139. Dicha secuencia se utilizó como secuencia referencia (Query) en una búsqueda mediante Blast de proteínas (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en diferentes microorganismos y organismos, el cual proporciona información sobre la cobertura de las secuencias y los porcentajes de identidad con respecto al templado. Se seleccionaron las secuencias con un porcentaje de identidad de 13-73 % con respecto a la secuencia de referencia. Mediante el programa Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018) y T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) generamos un alineamiento múltiple de secuencias, del que obtuvimos el porcentaje de conservación de cada posición **Figura 7**.

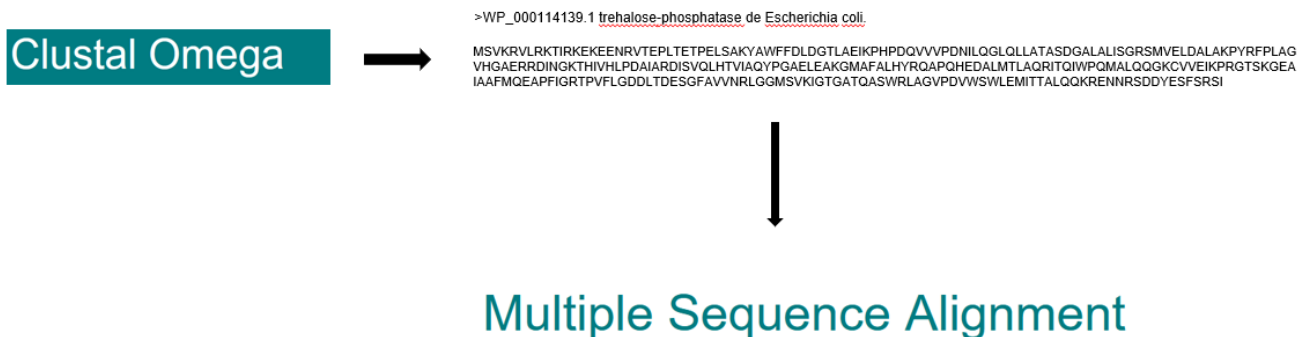


Figura 7. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para realizar el alineamiento múltiple con Clustal Omega y T-Coffee.

Modelado de proteínas por SWISS-MODEL.

Modelado por homología de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*.

A partir de la estructura de una trehalosa fosfatasa de (estructura en el PDB con el mayor porcentaje de identidad con respecto a la secuencia de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*) generamos un modelo de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*.

La estructura tridimensional de las proteínas nos da información valiosa sobre su función, el predictor de estructuras SWISS-MODEL, nos permite generar modelos estructurales basados en homología de estructuras de proteínas depositas en banco de datos o PDB, generando modelos en formato PDB o coordenadas atómicas, una vez que se obtiene el modelo **Figura 8**, la función de QMEAN evalúa la calidad del modelo a escala global y local (Benkert *et al*, 2011).

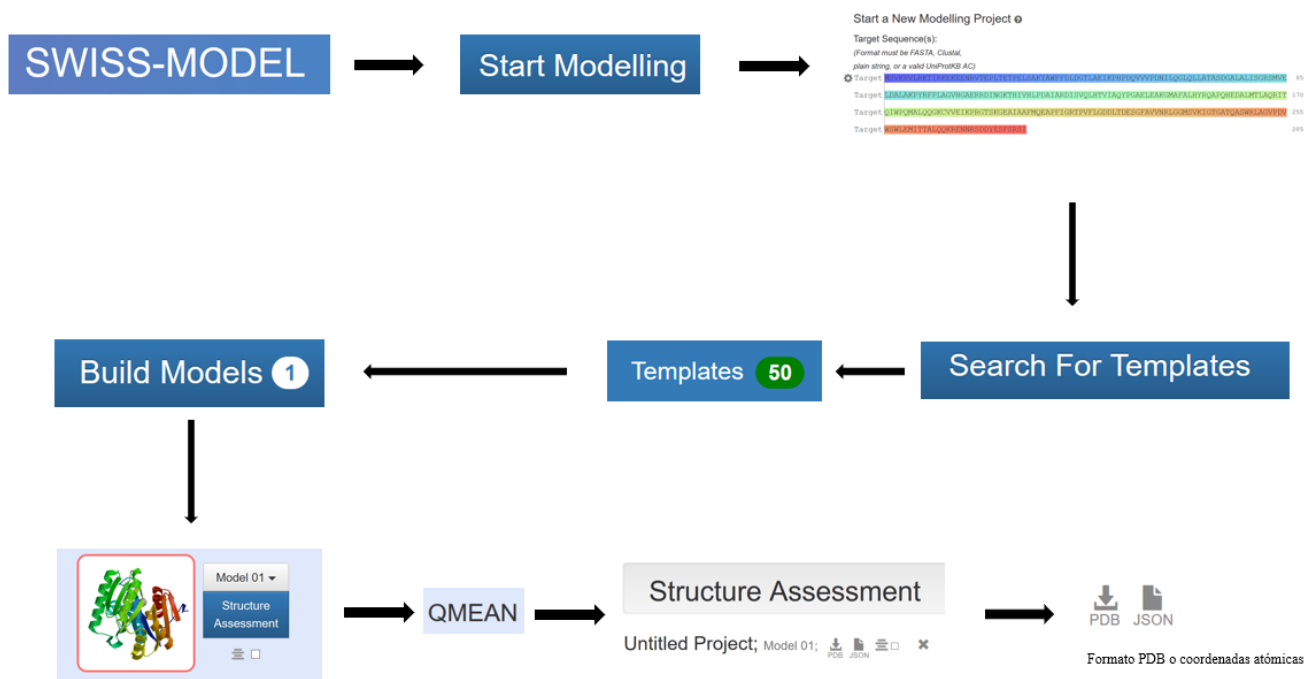


Figura 8. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL para generar un modelo tridimensional basado en homología de la fosfatasa de *E. coli*.

Las coordenadas atómicas generadas por SWISS-MODEL son utilizadas por el programa CHARMM-GUI, para asignar a cada átomo los parámetros de un campo de fuerza CHARMM-

35 y agregar los átomos de hidrógeno al modelo generado por el servidor SWISS-MODEL, produciendo un nuevo modelo en formato compatible con GROMACS (.pdb, .gro, .psf), así como el archivo con la topología (.top) **Figura 9.**

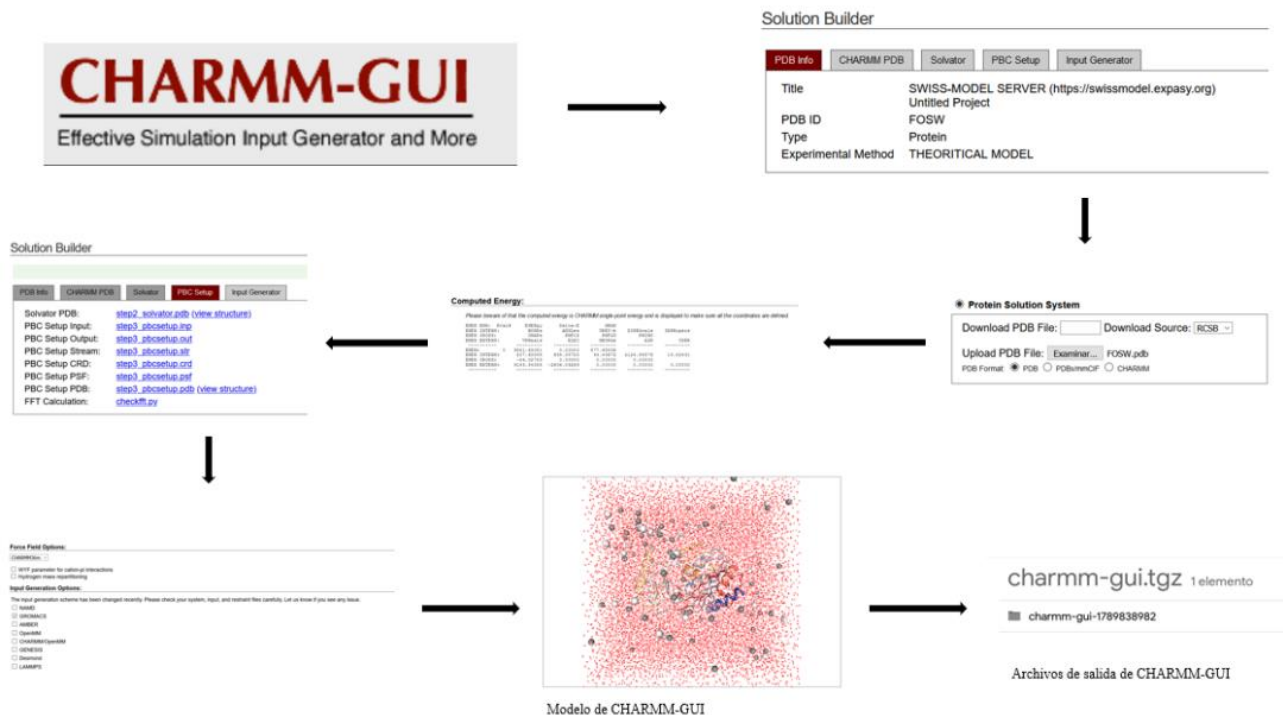


Figura 9. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI para generar un modelo tridimensional con campos de fuerza y los átomos de hidrogeno de la fosfatasa de *E. coli*.

Los archivos de salida que genera CHARMM-GUI son utilizados por el programa GROMACS para generar el modelo final, el cual fue sometido a múltiples ciclos de minimización de energía, eliminando los choques estéricos. Finalmente, GROMACS nos genera el modelo final, para el cual corresponde la menor energía **Figura 10.** Todos los modelos fueron analizados por el visualizador PyMOL (Mooers, 2020).

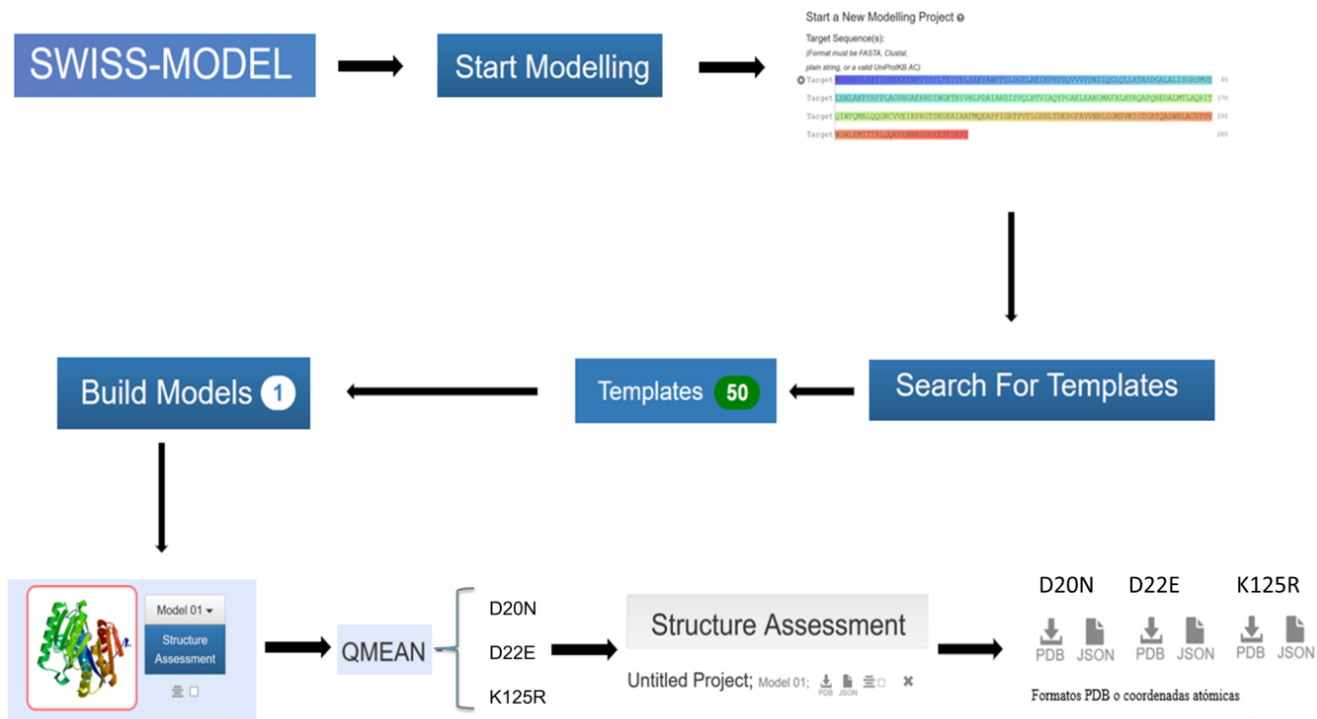


Figura 11. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL para generar los modelos de las mutantes (D20N, D22E y K125R) de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*.

Las coordenadas atómicas generadas por SWISS-MODEL fueron utilizadas por el programa CHARMM-GUI para asignar a cada átomo los parámetros del campo de fuerza CHARMM-35 y adicionar los átomos de hidrógeno a los modelos generados por el servidor SWISS-MODEL produciendo un nuevo modelo para cada mutante en formato compatible con GROMACS (.pdb, .gro, .psf), así como el archivo con la topología (.top) **Figura 12.**

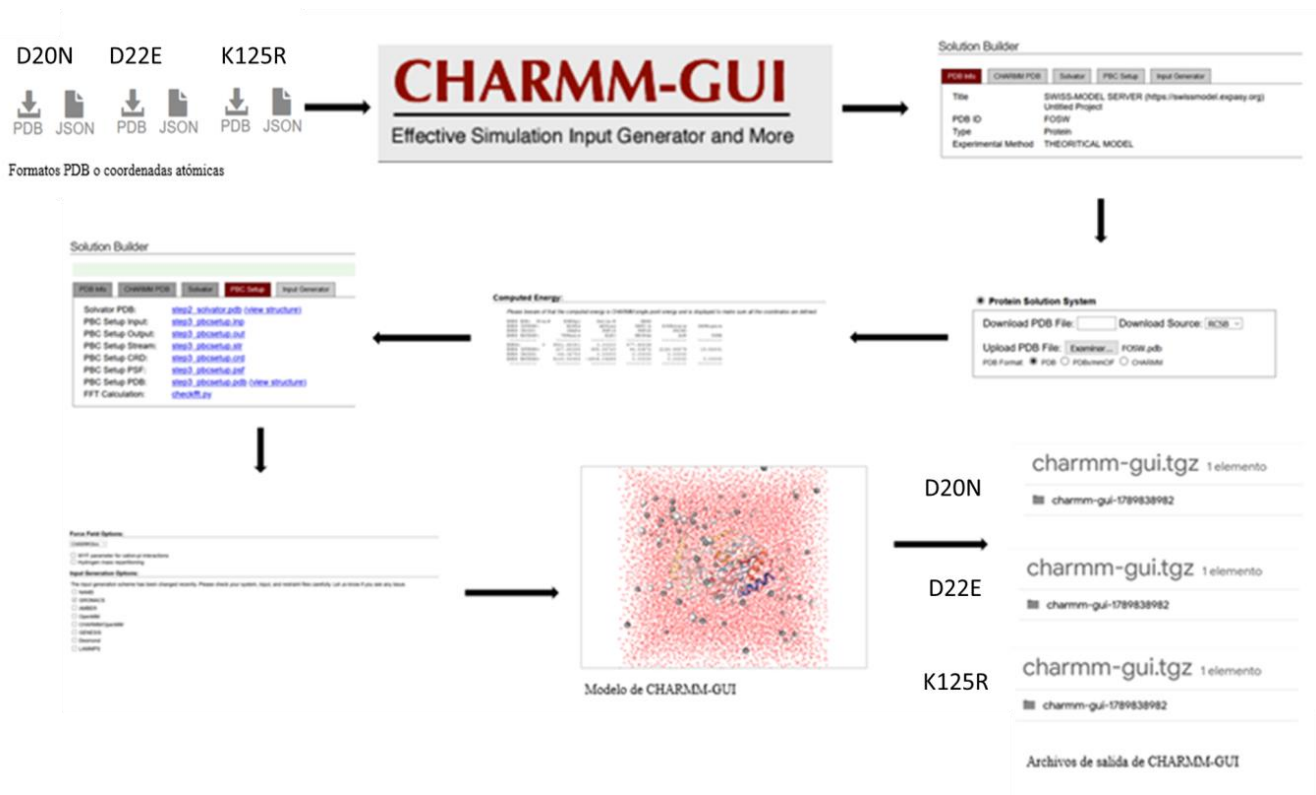


Figura 12. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI, para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R.

Los archivos de salida que genera CHARMM-GUI son utilizados por el programa GROMACS para generar los modelos finales, los cuales fueron sometidos a múltiples ciclos de minimización de energía eliminando los choques estéricos. Finalmente, GROMACS nos genera el modelo final de cada mutante **Figura 13**. Todos los modelos fueron analizados por el visualizador PyMOL (Moers, 2020).

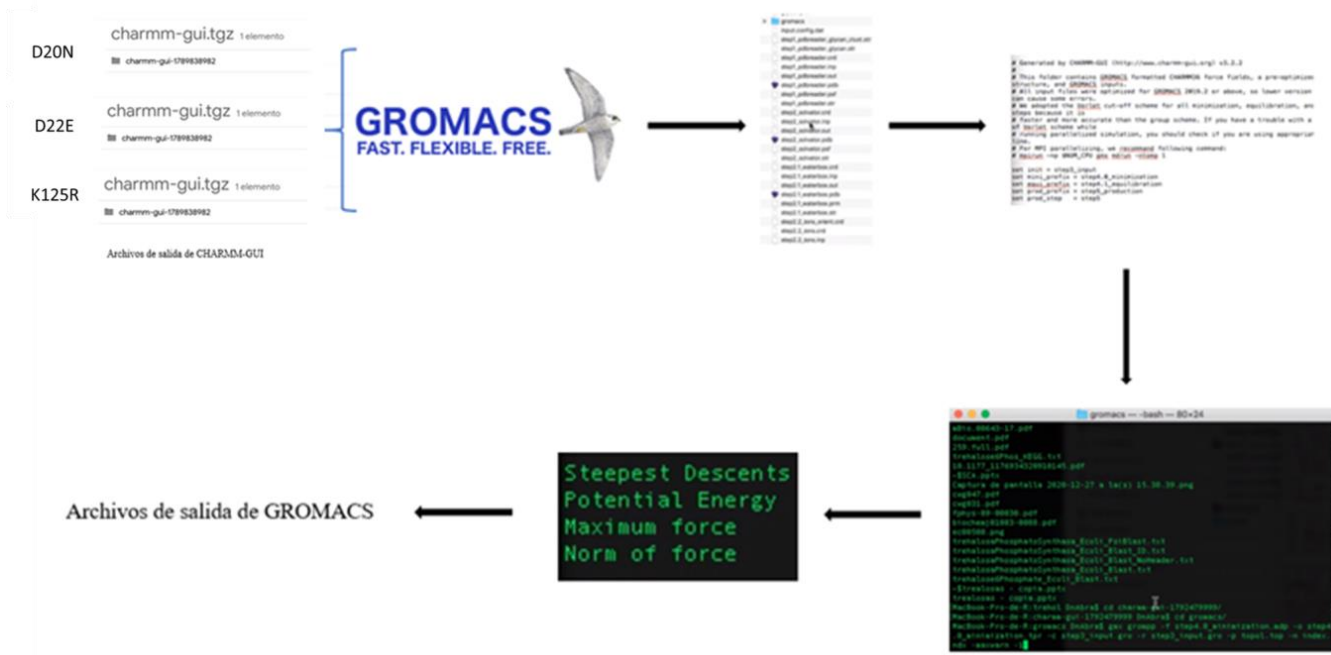


Figura 13. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R de trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

Superposición de los modelos de trehalosa fosfatasa de *E. coli* con las estructuras de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium*.

Los modelos generados por GROMACS de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* y de sus mutantes en las posiciones D20N, D22E y K125R, fueron comparados con las estructuras depositadas en el PDB de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* con trehalosa y con inhibidor denominadas por su código de PDB: 6UPD y 6UPE, respectivamente. La superposición de los modelos con las estructuras, se llevaron por medio del visualizador PyMOL usando la función cealign, la cual indica los valores de la raíz de la desviación cuadrática media o RMSD (**Root-Mean-Square Deviation**) con valores muy cercanos a cero.

RESULTADOS

Búsqueda de secuencias completas de trehalosa fosfatasa

Iniciamos la búsqueda de las secuencias en formato FASTA de la enzima trehalosa fosfatasa en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) **Figura 22**, identificando secuencias de fosfatasas en diferentes microorganismos: bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Xanthomonas campestris*, etc), y organismos como: plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, etc), entre otros. Utilizando como secuencia de referencia, consulta o template (Query) la secuencia de aminoácidos de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* en el protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mediante los programas de alineamientos múltiples Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018) y T-Coffee (Notredame et al., 2000) obtuvimos información sobre la cobertura de las secuencias y los porcentajes de identidad con respecto al template **Figura 14**.

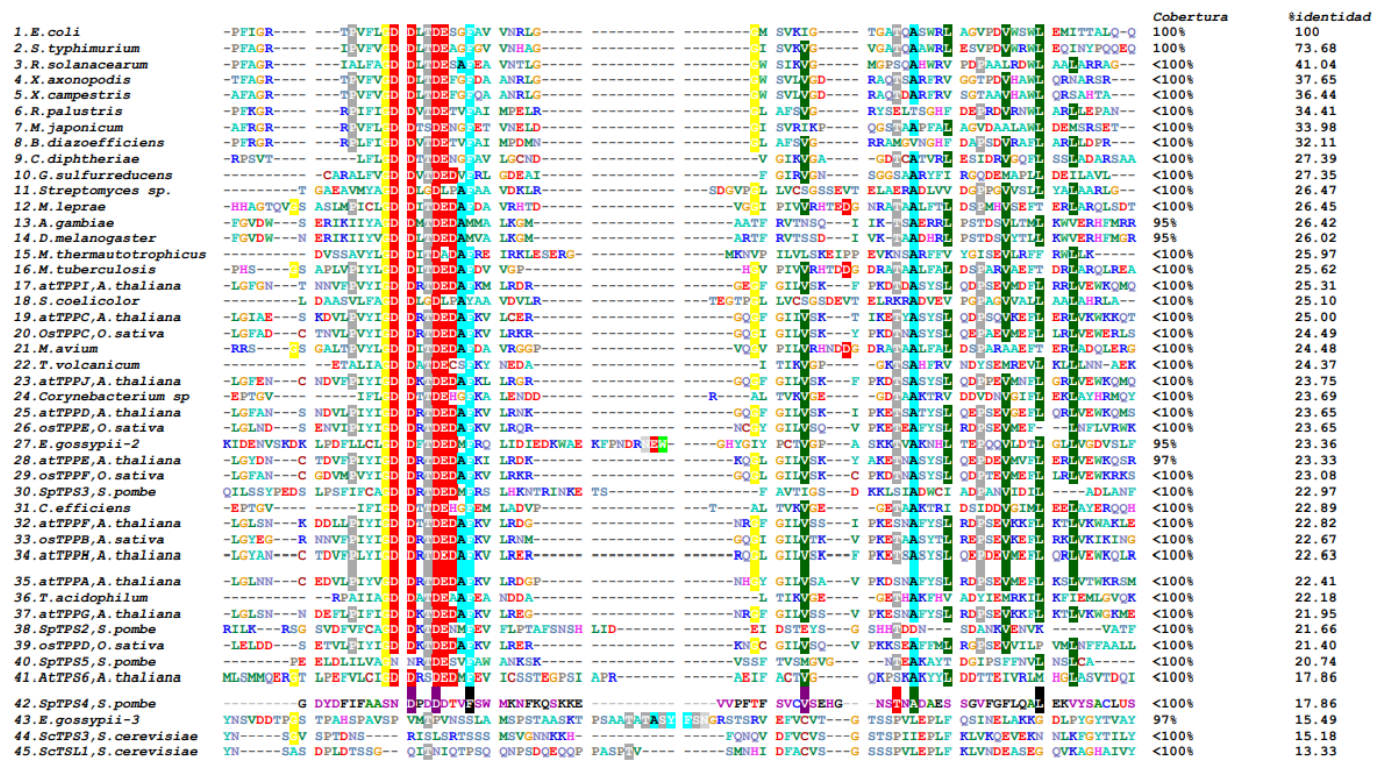


Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la trehalosa fosfatasa de diferentes microorganismos y organismos, comparados con la secuencia de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, destacando la cobertura y el porcentaje de identidad realizados por T-Coffee.

De las 45 secuencias analizadas en este alineamiento la secuencia de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella thyphimurium* es la que presenta el mayor porcentaje de identidad (73.68%) a la secuencia de *E. coli* **Figura 14**.

Modelado de proteínas por SWISS-MODEL.

Modelado por homología de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*.

En el PDB hay varias estructuras depositadas de trehalosa fosfatasa con un alto porcentaje de identidad a la secuencia que presenta la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, lo cual es importante para el modelado por homología generando un modelo de la fosfatasa de *Escherichia coli*, utilizando como templado la estructura cristalográfica depositada en el PDB de trehalosa fosfatasa de *Salmonella thyphimurium* con trehalosa en su sitio activo, código de PDB: (6UPD) (Harvey *et al.*, 2020) **Figura 15**.

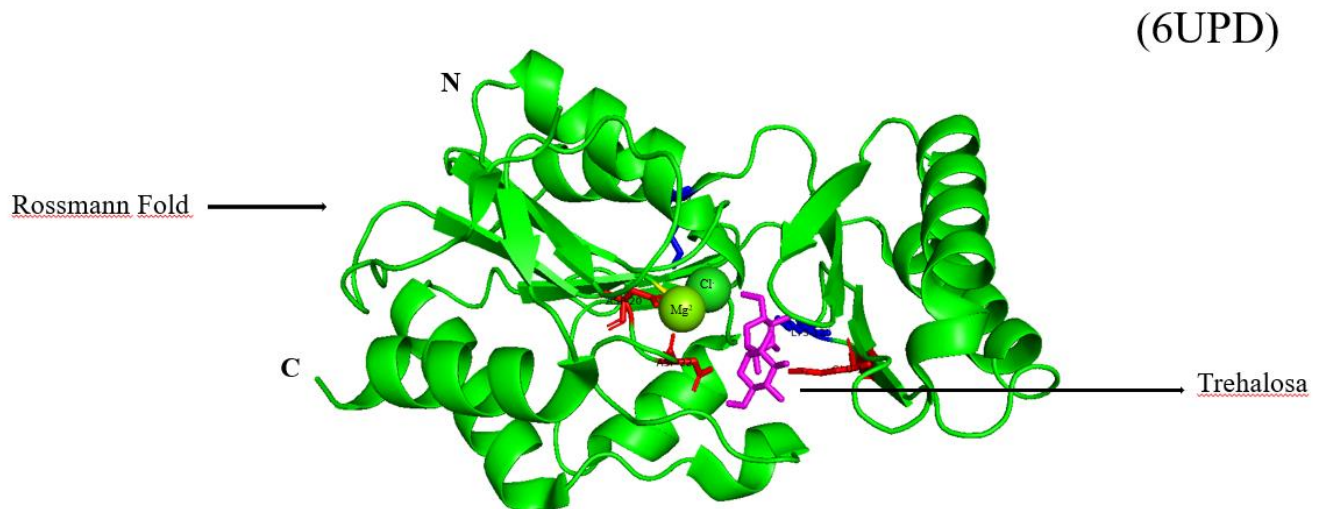
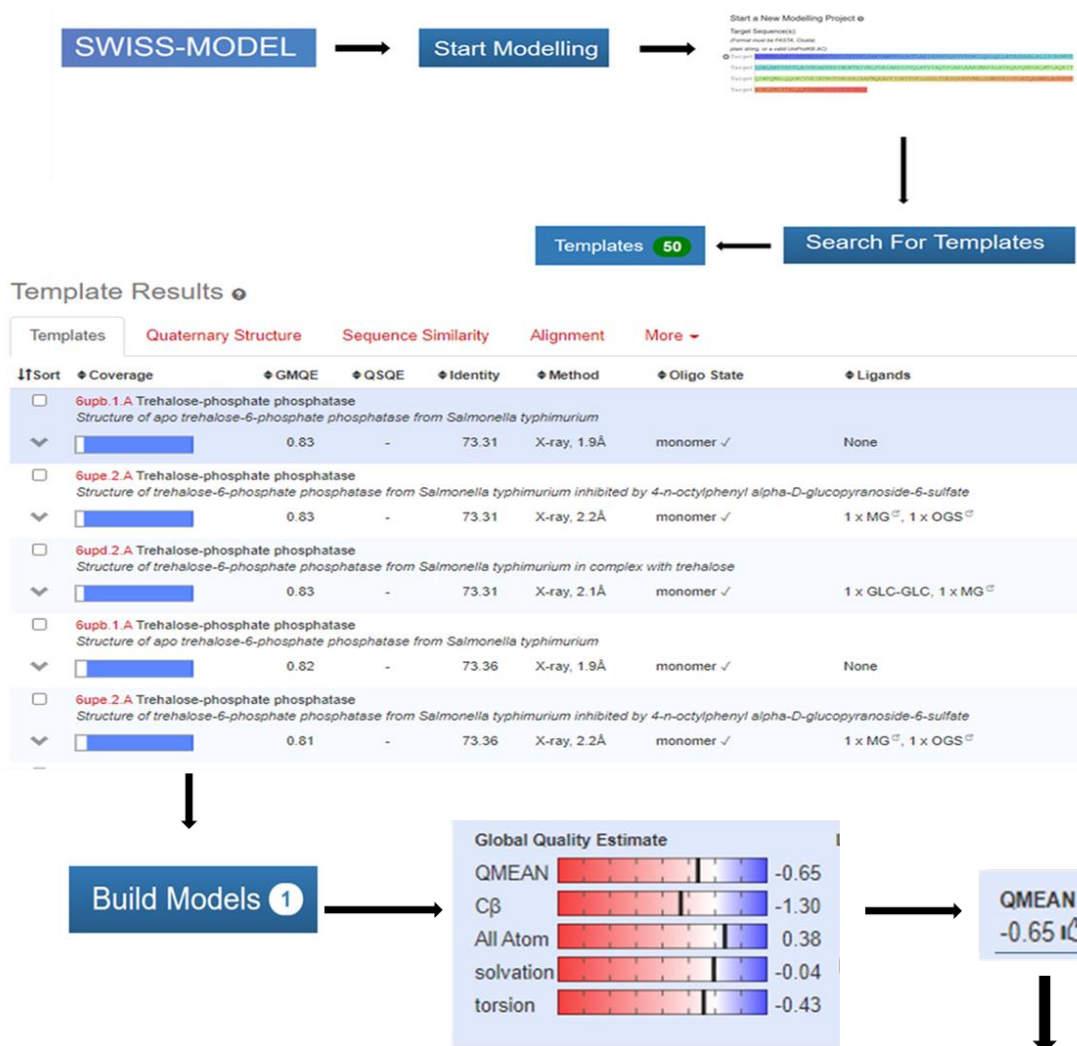


Figura 15. Vista lateral de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella thyphimurium* código de PDB (6UPD), formada por un dominio Rossmann Fold en el centro están las hebras beta rodeadas por alfa hélices (color verde), la trehalosa está en color morado, se muestran los extremos N y C-terminal (letras negras), los aminoácidos del sitio activo los aminoácidos ácidos,

aminoácidos ácidos (color rojo), los polares (amarillo) y los básicos (azul) los iones de Mg^{2+} y Cl^- son esferas de color verde, visualizados por PyMOL.

La estructura tridimensional de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium*, fue resuelta por medio de la difracción de rayos X a una resolución de 2.05 Å mostrando un plegamiento Rossmann fold, formado por hebras beta en el centro rodeadas por alfa hélices, en el sitio activo ésta presente una molécula de trehalosa y los iones de Mg^{2+} y Cl^- código de PDB (6UPD) (Harvey *et al*, 2020). El porcentaje de identidad que presenta con la trehalosa fosfatasa de *E. coli* fue de 73.68%.

El modelo generado de la fosfatasa de *E. coli* por SWISS-MODEL, nos dio un valor de QMEAN=-0.65 lo cual califica muy bien al modelo (la calidad aceptable para los modelos se encuentra entre 0 y -4.0) **Figura 16.**



el QMEAN, indica un buen ajuste de la secuencia de *E. coli* **Figura 16** a la estructura molde de *Salmonella typhimurium* código de PDB (6UPD).

En SWISS-MODEL los valores en la evaluación de estructuras o Structure Assessment (**Figura 16**) indica que hay un buen acuerdo entre los ángulos ϕ (phi) y ψ (psi) del modelo generado y valores reportados previamente, como se puede observar en el gráfico de Ramachandran (las zonas sombreadas corresponden a los valores observados en hebras- β y hélices- α) **Figura 17**.

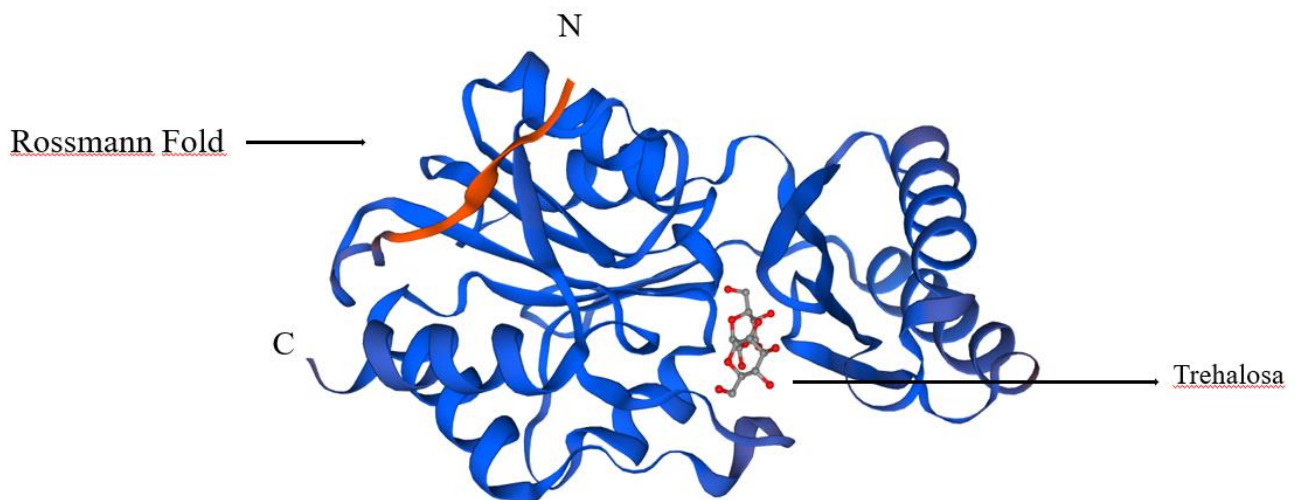


Figura 17. Modelo tridimensional de la trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, el dominio Rossmann Fold en color azul marino, se observa la molécula de trehalosa en color gris con rojo, se marcan con letras negras las regiones amino y carboxilo terminal generadas por SWISS-MODEL.

Las coordenadas atómicas del modelo de fosfatasa de *E. coli* en formato PDB generadas por SWISS-MODEL, fueron usadas por el programa CHARMM-GUI, para asignar a cada átomo los parámetros correspondientes del campo de fuerza CHARMM-35 y agregar los átomos de hidrógeno al modelo generado por SWISS-MODEL produciendo un nuevo modelo en formato compatible con GROMACS (.pdb, .gro, .psf) y el archivo de topología **Figura 18**. Se observa el modelo de la fosfatasa (azul y amarillo) dentro de una caja de agua, en color rojo se encuentran

El modelo de fosfatasa generado por CHARMM-GUI presenta un dominio Rossmann Fold (color cian, representación cartoon), unida a una molécula de trehalosa de (color anaranjado, representación de palo o stick). Este modelo está dentro de una caja de agua que tiene 150mM de buffer MgCl₂ pH 8 mostrando los átomos de Mg²⁺ y Cl⁻ (color verde), donde se modificó el tamaño de los átomos de Cl⁻ para poder diferenciarlos de los de Mg²⁺ **Figura 19**.

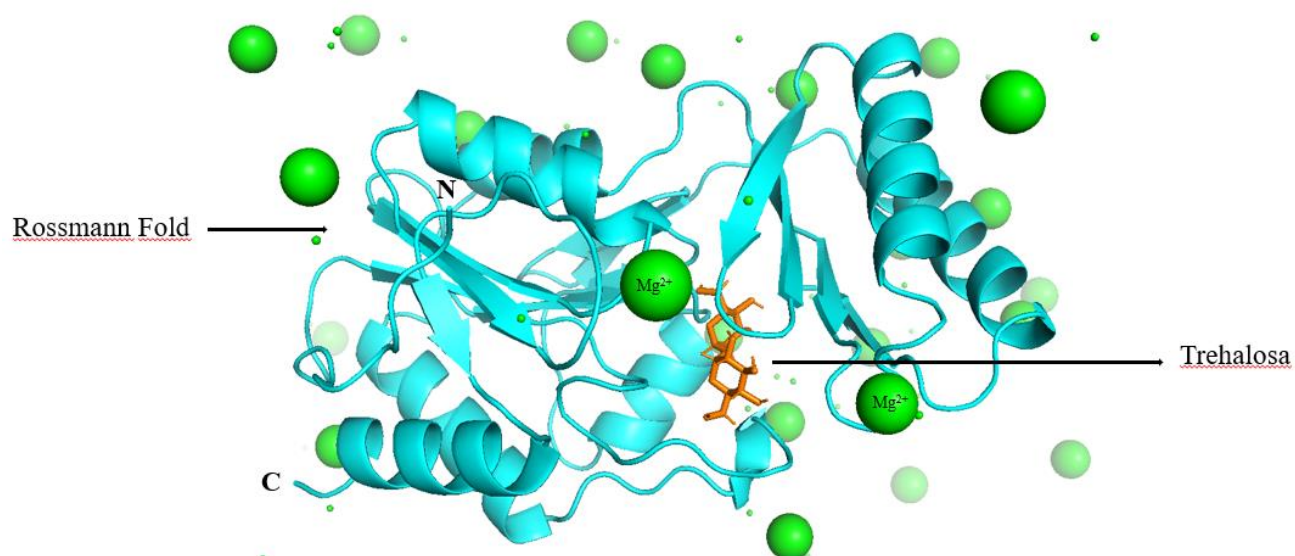


Figura 19. Modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, en color cian el dominio Rossmann Fold, la trehalosa en color anaranjado, las esferas en color verde son los iones de Mg²⁺ y Cl⁻ generados por CHARMM-GUI y visualizado por PyMOL.

Los archivos de salida que genera el programa CHARMM-GUI, fueron empleados por el programa GROMACS para eliminar los choques estéricos o clashes que presente el modelo de CHARMM-GUI, el cual fue sometido a 1000 ciclos de minimización generando el modelo más estable del potencial energético negativo **Tabla 1**.

```

Steepest Descents converged to Fmax < 1000 in 1171 steps
Potential Energy = -8.6201838e+05
Maximum force = 9.2151208e+02 on atom 317
Norm of force = 1.6601682e+01

```

Tabla 1. Muestra el número de ciclos utilizados, el potencial energético del modelo de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* analizados por el programa GROMACS.

El diagrama muestra los procedimientos computacionales realizados para generar el modelo final de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS Figuras 20 y 21.

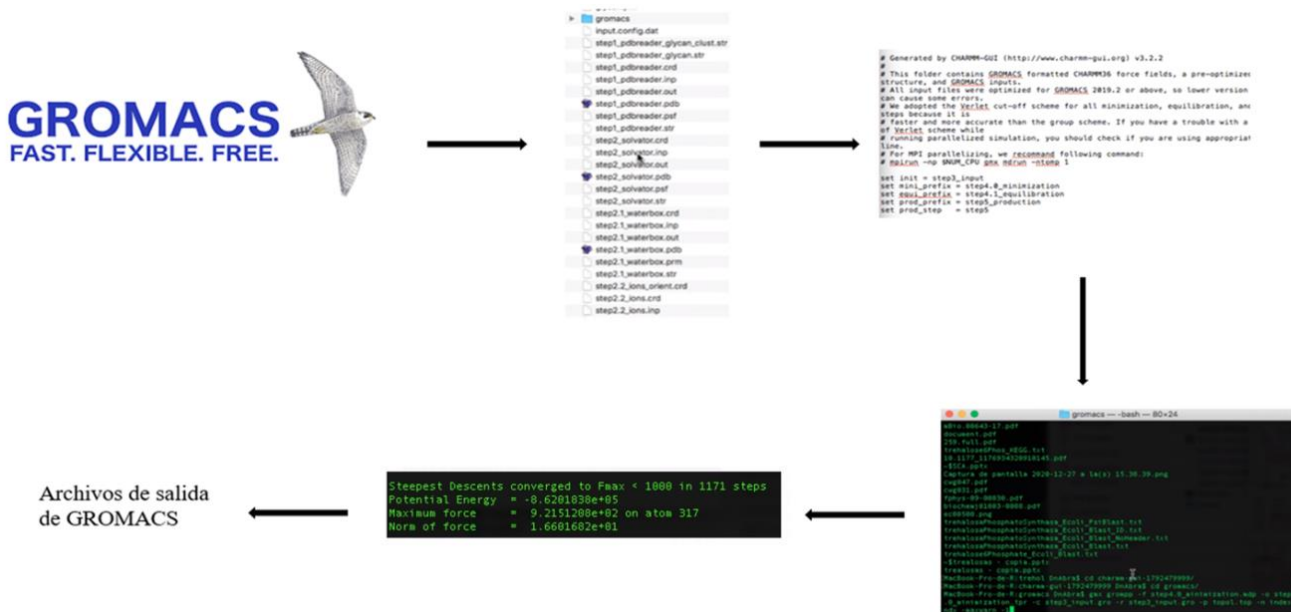


Figura 20. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar el modelo final de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

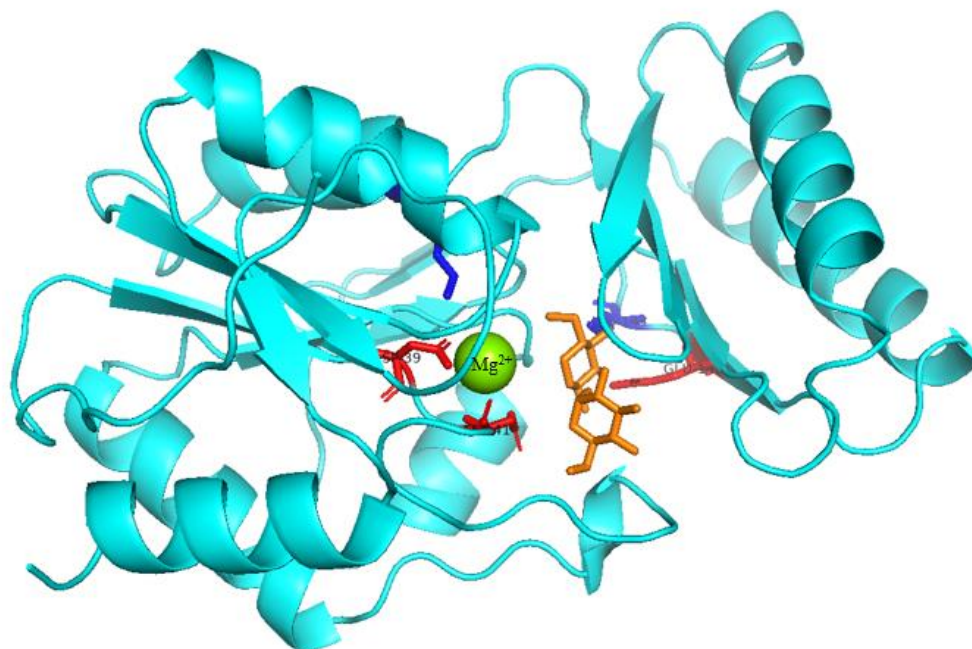


Figura 21. Modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli*, en color ciano el dominio Rossmann Fold, los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillos, rojos y verdes), la molécula de trehalosa (anaranjado) y el ion Mg^{2+} es esfera (verde) generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Aminoácidos del sitio activo de trehalosa fosfatasa de *E. coli* y el análisis de los mismos aminoácidos en el resto de las secuencias de fosfatasas de microorganismos y organismos.

Identificamos 44 secuencias de fosfatasas en diferentes microorganismos: bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, etc) y organismos como: plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, etc), entre otros utilizando como secuencia templado la secuencia de aminoácidos de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* en el protein BLAST. Mediante los programas de alineamientos múltiples como: Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2018) y T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000), obtuvimos la cobertura y la identidad de las secuencias **Figura 22.**

1. <i>E. coli</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
2. <i>S. typhimurium</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
3. <i>R. solanacearum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
4. <i>X. axonopodis</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
5. <i>X. campestris</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
6. <i>R. palustris</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
7. <i>M. japonicum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
8. <i>B. japonicum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
9. <i>C. diphtheriae</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
10. <i>G. sulfurreducens</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
11. <i>Streptomyces sp.</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
12. <i>M. leprae</i>	MEVID	PRRHSAALFD	LDAVVTDHPL	DSTVTLVRQL	QGIGVGTAVF	STNRNSQCVL	PANGLDHLFF	VHVDCLASGK	VTILVAAANR	IMACPGRCVV		
13. <i>A. gambiae</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
14. <i>D. melanogaster</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
15. <i>M. thermautotrophicus</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
16. <i>M. tuberculosis</i>	MRKLGHVVID	PRRH	-DAVLFDTL	DATQELVRQL	QEVGVGTGVF	GS-	-GLD-	-VPIVAAGR	LAVPGRCVV	-----		
17. atTPPI, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	MSAS	QNIVVSETTM	SSITPNNNN	N--NNSSSQK	LP-	-----	PC	LISISKKKLL	KNI-	
18. <i>S. coelicolor</i>	-----	-----	-----	MKITDISG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
19. atTPPC, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
20. osTPPC, <i>O. sativa</i>	-----	-----	-----	MTK	QSVVVEEVAV	PMPPNSAPLL	PYPPPRAAPG	-----	-----	-VAVRKKYLQ	AQL-	
21. <i>M. avium</i>	MCESCHVVID	PRRH	-DAVLFGVD	ALGSALASQL	QGIGVGTAAF	AADG-	-----	-----	-----	-PAAAADR	LRVPGRCVV	
22. <i>T. volcanicum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
23. atTPPJ, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	MVS	QNVVVSDAKT	GIITVSIVSN	SSVFTPTAQK	PPTA-	-----	PG	YISVSKKKLL	KNI-
24. <i>Corynebacterium sp</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
25. atTPPD, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	MTN	HNALISDAKG	SIGVAVRVPN	QSLFSPGGGR	-----	-----	YISIPRKKLV	QKL-	
26. osTPPE, <i>O. sativa</i>	-----	-----	-----	MDLSN	SSFVITD-PV	AISQLLGG-	-----	-----	-----	L	PSNLMQFSVM	PGGYSSSGMN
27. <i>E. gossypii-2</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
28. atTPPE, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
29. osTPPF, <i>O. sativa</i>	-----	-----	-----	MTN	QDVVVSEMGI	AAGAALPGGF	AGPAGGLFAC	RS-	-----	-----	AAASMRQTYL	DLA-
30. SpTPS3, <i>S. pombe</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
31. <i>C. efficiens</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
32. atTPPF, <i>A. thaliana</i>	MDLNSNH	KSSVLKDPSP	SVNQSRLG-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	VSSRFMMSQW	KK-	
33. osTPPB, <i>A. sativa</i>	-----	MTN	HAGFAADDAV	TAAVPVQAAQ	GGRHFFP-	-----	-----	-----	-----	-FLAPSSRL	TDC-	
34. atTPPH, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	M	VRFIEENTKL	VEKETGNKSN	ND-	-----	-----	-----	-VTTKKKAL	QDI-	
35. atTPPA, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	MDKSGH	SSPVMTD-SP	PISNSRLTIR	QNRLPYSSAA	ATAI-	-----	-----	-SQ	NNNLLLTVPR	KK-
36. <i>T. acidophilum</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
37. atTPPG, <i>A. thaliana</i>	MDLNINK	TTPVLSDPTT	PVSKTRLGS-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-SF	PSGRFMMNSR	KK-
38. SpTPS2, <i>S. pombe</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
39. osTPPD, <i>O. sativa</i>	-----	-----	-----	MKIS-	-----	-ANFLLN-	-----	-----	-----	-C	ARTYTKKKEL	KK-
40. SpTPS5, <i>S. pombe</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
41. AtTPS6, <i>A. thaliana</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
42. SpTPS4, <i>S. pombe</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
43. <i>E. gossypii-3</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
44. ScTPS3, <i>S. cerevisiae</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
45. ScTSL1, <i>S. cerevisiae</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Figura 22. Alineamiento múltiple de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* con 44 fosfatasas de diferentes microorganismos y organismos realizados por Clustal y T-Coffee, se destacan los aminoácidos del sitio activo (D20, L21, D22, S60, E123, K125 y K175) marcados con triángulos (color azul marino), adicionando al final de cada secuencia de fosfatasa los valores de cobertura, identidad y códigos de acceso en el NCBI.

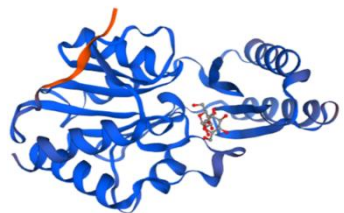
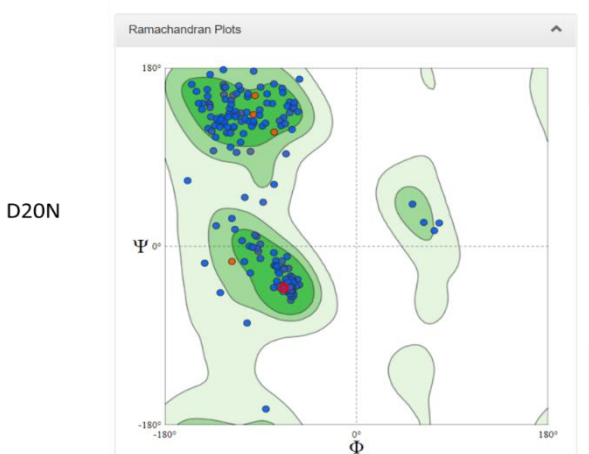
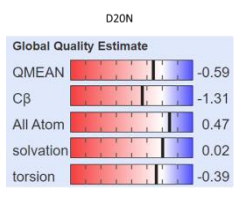
En el alineamiento múltiple de las secuencias de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* y de las 44 fosfatasas de diferentes microorganismos y organismos, identificamos los aminoácidos del sitio activo: D20, L21, D22, S60, E123, K125 y K175, los cuales están conservados en la mayoría de las secuencias analizadas en este trabajo, sin embargo de manera interesante para el caso de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*: *SpTPS5* presenta una mutación en solo uno de los aminoácidos del sitio activo y se encuentra localizada en la posición del Asp 20 cambiado a Asn (D20N), lo cual implica la eliminación de una carga negativa. La otra secuencia que consideramos en este alineamiento que presenta otra mutación muy interesante, se encuentra en otro aminoácido del sitio activo y en este caso está presente en el hongo: *E. gossypii-3* la mutación está en la posición del Asp 22 mutado a Glu (D22E) y aquí hay una conservación de carga negativa, además de un -CH₂- más en la cadena lateral del Glu.

Modelado por homología de las mutantes de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*.

Con el análisis de las secuencias de las fosfatasas por Clustal Omega, seleccionamos las mutantes en el sitio activo de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* en las posiciones D20N presente en la levadura *S. pombe* TPS5; D22E presente en el hongo *E. gossypii-3* y K125R (mutación propuesta para mantener la carga positiva pero cambiar el grupo amino por un grupo guanidinio en su cadena lateral). Para la generación de estos modelos utilizamos a SWISS-MODEL formando nuevos PDBs o coordenadas atómicas **Figura 23.**



Templates	Quaternary Structure	Sequence Similarity	Alignment	More					
Sort	Coverage	GMQE	QSQE	Identity	Method	Oligo State	Ligands		
<input type="checkbox"/>	6upb.1.A	Trehalose-phosphate phosphatase	Structure of apo trehalose-6-phosphate phosphatase from <i>Salmonella typhimurium</i>	0.84	-	72.93	X-ray, 1.9Å	monomer ✓	None
<input type="checkbox"/>	6upe.2.A	Trehalose-phosphate phosphatase	Structure of trehalose-6-phosphate phosphatase from <i>Salmonella typhimurium</i> inhibited by 4-n-octylphenyl alpha-D-glucopyranoside-6-sulfate	0.83	-	72.93	X-ray, 2.2Å	monomer ✓	1 x MG ²⁺ , 1 x OGS ²⁺
<input checked="" type="checkbox"/>	6upd.2.A	Trehalose-phosphate phosphatase	Structure of trehalose-6-phosphate phosphatase from <i>Salmonella typhimurium</i> in complex with trehalose	0.83	-	72.93	X-ray, 2.1Å	monomer ✓	1 x GLC-GLC, 1 x MG ²⁺
<input type="checkbox"/>	6upb.1.A	Trehalose-phosphate phosphatase	Structure of apo trehalose-6-phosphate phosphatase from <i>Salmonella typhimurium</i>	0.82	-	72.69	X-ray, 1.9Å	monomer ✓	None
<input type="checkbox"/>	6upe.2.A	Trehalose-phosphate phosphatase	Structure of trehalose-6-phosphate phosphatase from <i>Salmonella typhimurium</i> inhibited by 4-n-octylphenyl alpha-D-glucopyranoside-6-sulfate	0.82	-	72.69	X-ray, 2.2Å	monomer ✓	1 x MG ²⁺ , 1 x OGS ²⁺



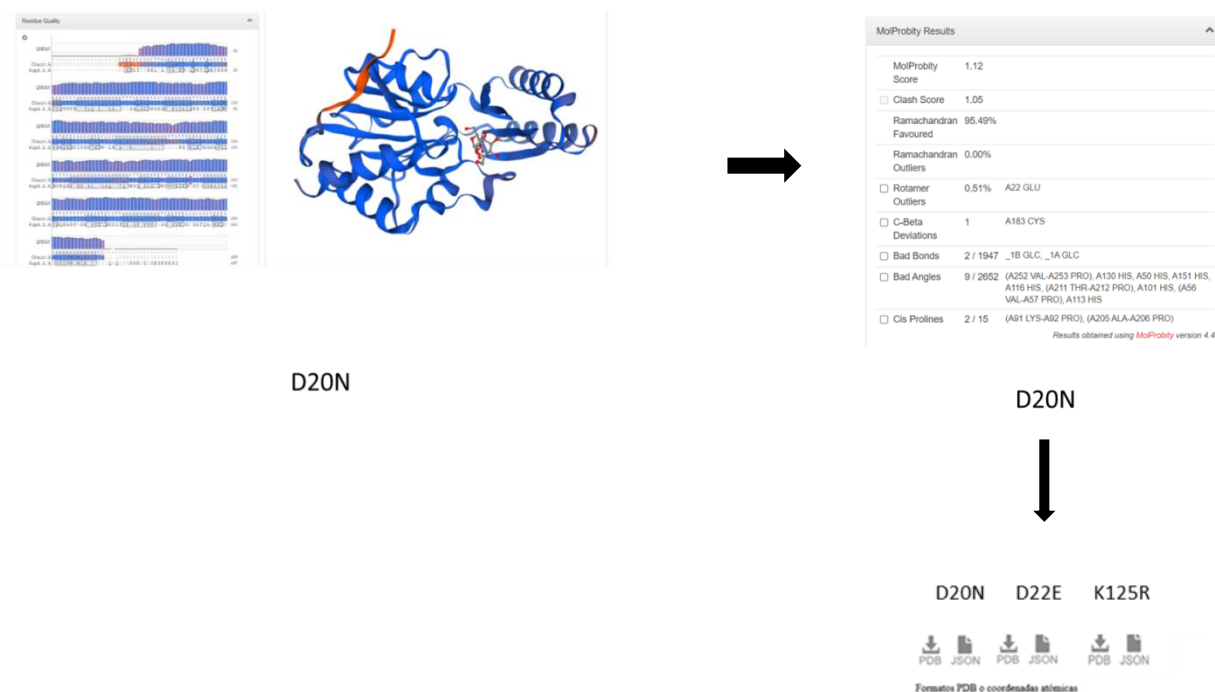


Figura 23. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por SWISS-MODEL, para generar los modelos de las mutantes (D20N, D22E, K125R) de la trehalosa fosfatasa de *E. coli*.

Las coordenadas atómicas (D20N PDB, D22E PDB y K125R PDB) generadas por SWISS-MODEL, fueron utilizadas por el programa CHARMM-GUI asignando parámetros de un campo de fuerza CHARMM-35 a átomos o grupos de átomos y colocando los átomos de hidrogeno a los modelos generados por el servidor SWISS-MODEL, produciendo un nuevo modelo para cada mutante en formato CHARMM-GUI **Figura 24.**

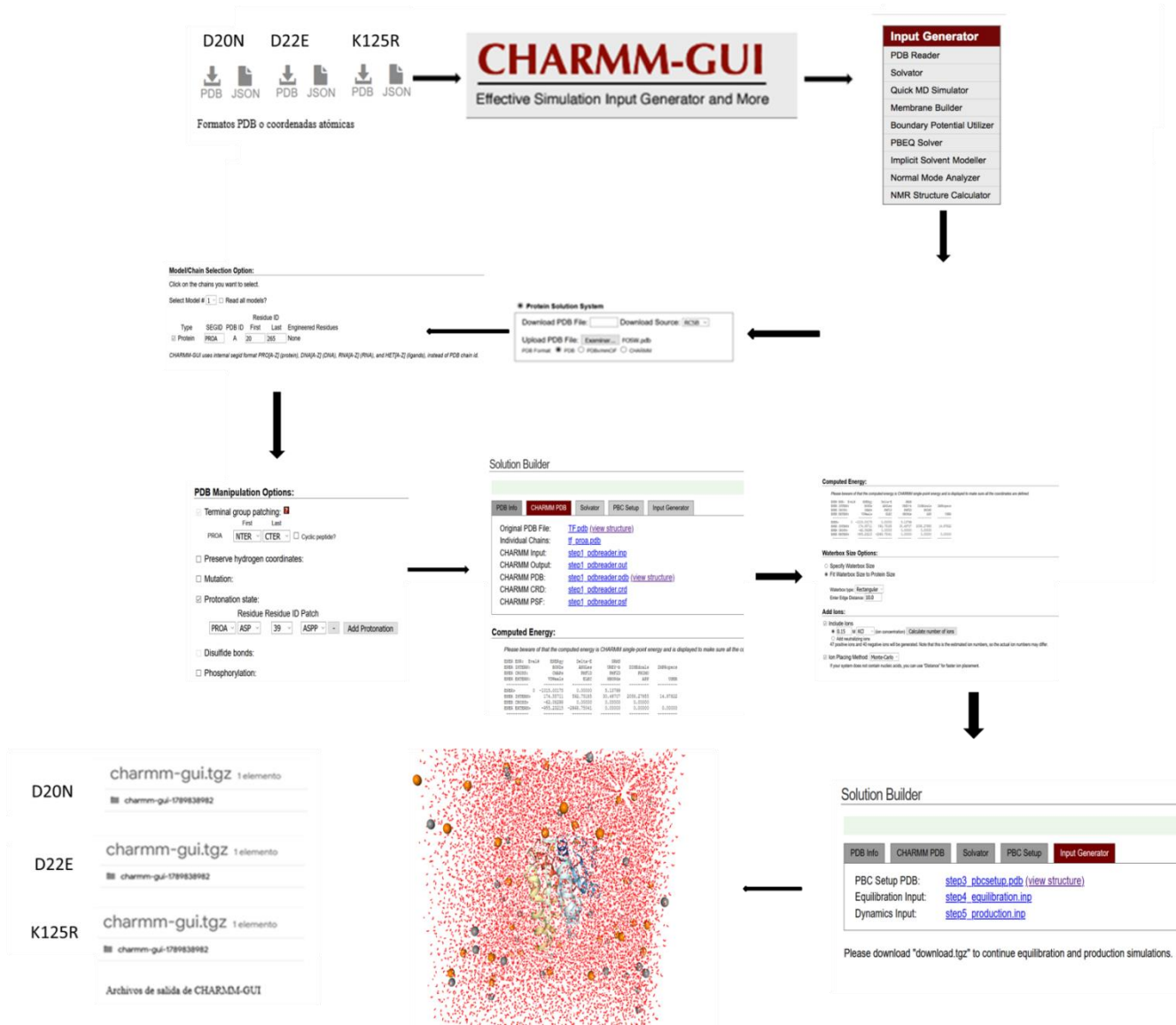


Figura 24. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados por CHARMM-GUI, para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R.

Los archivos de salida que genera CHARMM-GUI (D20N PDB, D22E PDB y K125R PDB) fueron utilizados por el programa GROMACS para generar los modelos finales, los cuales se sometieron a 1000 ciclos de minimización eliminando los impedimentos estéricos Tabla 2.

Mutante de Fosfatasa de <i>E.coli</i> D20N	<pre>Steepest Descents converged to Fmax < 1000 in 135 steps Potential Energy = -8.2647088e+05 Maximum force = 9.7387360e+02 on atom 2414 Norm of force = 3.5231917e+01</pre>
Mutante de Fosfatasa de <i>E. coli</i> D22E	<pre>Steepest Descents converged to Fmax < 1000 in 745 steps Potential Energy = -8.5662525e+05 Maximum force = 9.9865955e+02 on atom 3217 Norm of force = 1.9651328e+01</pre>
Mutante de fosfatasa de <i>E. coli</i> K125R	<pre>Steepest Descents converged to Fmax < 1000 in 146 steps Potential Energy = -8.2842562e+05 Maximum force = 9.6463330e+02 on atom 2266 Norm of force = 3.3989574e+01</pre>

Tabla 2. Muestra el número de ciclos utilizados y el potencial energético de cada modelo de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* (D20N, D22E, K125R) analizados por el programa GROMACS.

GROMACS nos genera el modelo final de cada mutante **Figura 25**. Todos los modelos fueron analizados por el visualizador PyMOL (Mooers, 2020).

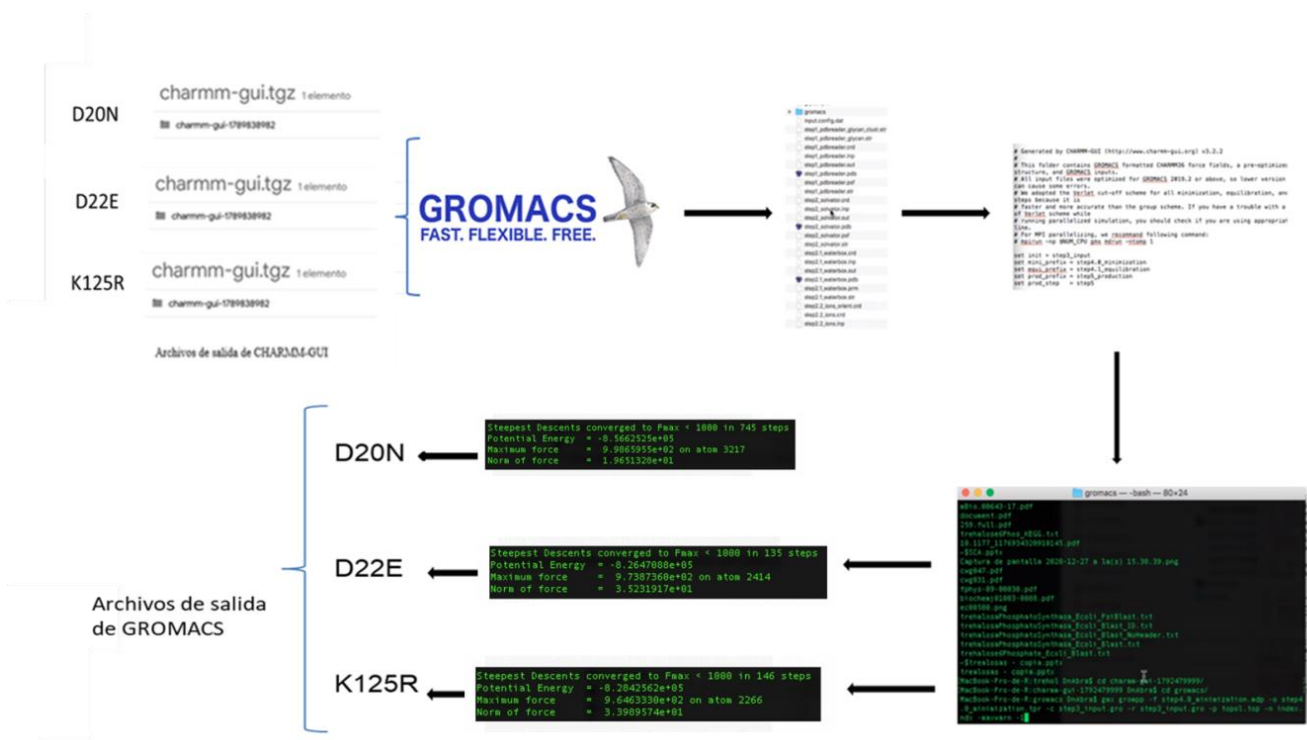


Figura 25. Diagrama de los procedimientos computacionales realizados para generar los modelos de las mutantes D20N, D22E y K125R de trehalosa fosfatasa de *E. coli* por medio de GROMACS.

Los modelos generados por GROMACS de las mutantes D20N, D22E y K125R de trehalosa fosfatasa de *E. coli* Figuras 26, 27 y 28.

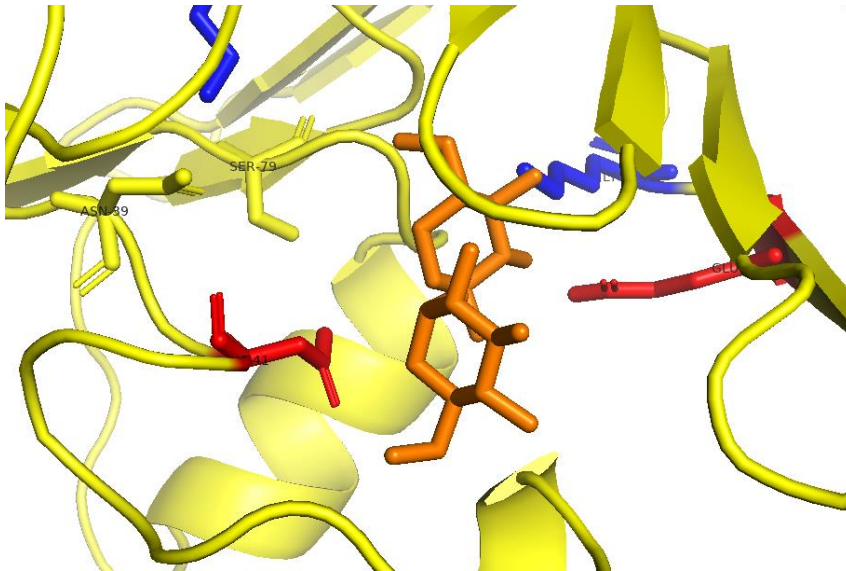


Figura 26. Sitio activo de la mutante D20N de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, el dominio Rossmann Fold (color amarillo), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillos, rojos y azules), la molécula de trehalosa (anaranjado), la mutación D20N (amarillo) generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

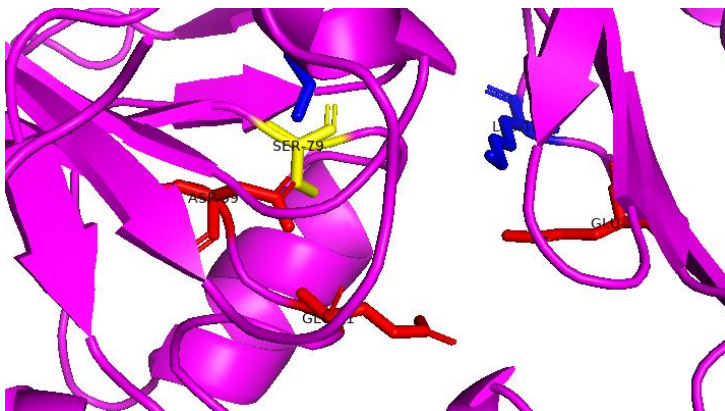


Figura 27. Acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de la mutante D22E del Modelo tridimensional de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, el dominio Rossmann Fold (color rosa), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillos, rojos y azules), la mutación D22E (rojo) generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

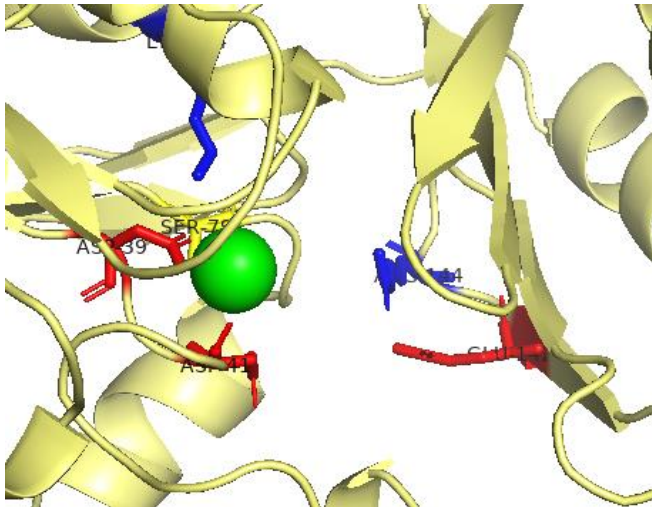


Figura 28. Acercamiento de los aminoácidos del sitio activo de la mutante K125R del Modelo tridimensional de la Trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, el dominio Rossmann Fold (color amarillo metálico), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillos, rojos y azules), la mutación K125R (azul) generado por GROMACS y visualizado por PyMOL.

Superposición de los modelos de trehalosa fosfatasa de *E. coli* con las estructuras de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium*.

Los modelos generados por GROMACS de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* y de sus mutantes D20N, D22E y K125R, fueron comparados con las estructuras depositadas en el PDB de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* con trehalosa y con inhibidor denominadas por su código de PDB: 6UPD y 6UPE respectivamente (Harvey *et al.*, 2020). La superposición de los modelos con las estructuras, se llevaron por medio del visualizador PyMOL utilizando la función cealign que produce los valores de la raíz de la desviación cuadrática media o RMSD (**Root-Mean-Square Deviation**). El valor de RMSD generado por PyMOL que presentó la superposición de la estructura de la fosfatasa de *Salmonella typhimurium* (6UPD), con el modelo de la fosfatasa de *E. coli* generado por GROMACS fue de 0.082395 sobre 240 residuos **Figura 29.**

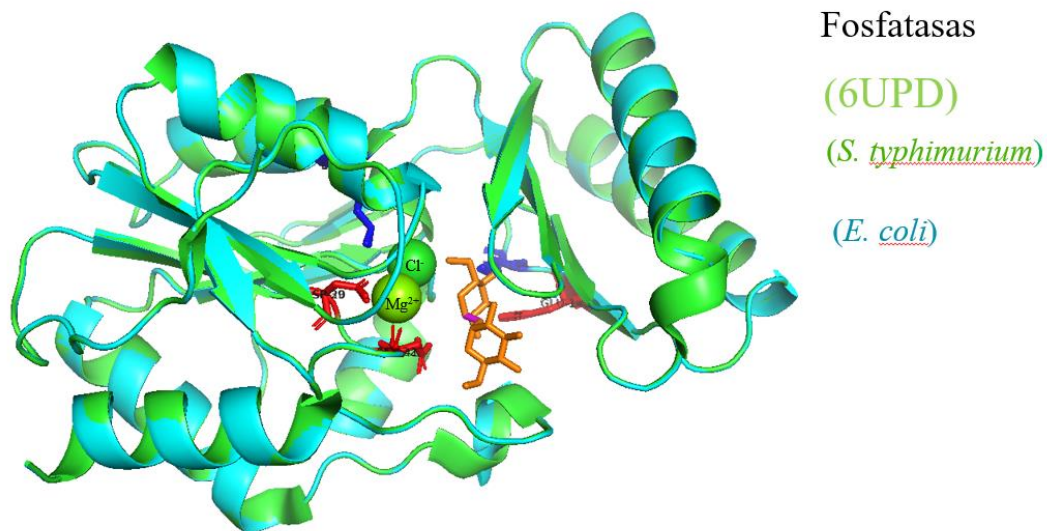


Figura 29. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD (verde), con el modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* (cyan), el dominio Rossmann Fold (verde-cyan), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillo, rojo y azul), la molécula de trehalosa (anaranjado), los átomos de Mg^{2+} y Cl^{-} esferas (verde) generado por PyMOL.

Los valores de RMSD para los modelos generados por GROMACS de las mutantes D20N (RMSD= 0.529726 sobre 240 residuos), D22E (RMSD= 0.085752 sobre 240 residuos) y K125R (RMSD= 0.437797 sobre 240 residuos) de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* con las estructuras depositadas en el PDB de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* con trehalosa código de PDB: 6UPD.

DISCUSION

Las bacterias han podido adaptarse a diferentes tipos de ambientes, por ejemplo las que viven en los ambientes extremos, entre las que destacan aquellas que son capaces de sobrevivir a altas temperaturas o Termófilos por ejemplo (*Thermotoga marítima* (Noll, 2013), *Methanococcus jannaschii*, (Kim y Whitman, 2014), etc, las que son capaces de vivir a temperaturas por debajo de los 5°C o Psicrófilos (*Flavobacterium* (Chauhan *et al.*, 2015), *Marinomonas* (Liu *et al.*, 2019), etc, las que son capaces de vivir a altas concentraciones de sal o Halófilos (*Halanaerobium praevalens* (Ivanova *et al.*, 2011) y *Orenia metallireducens* (Dong *et al.*, 2016) etc). Los microorganismos extremófilos presentan características bioquímicas y metabólicas que les han permitido vivir en hábitats poco comunes, resultando ser microorganismos muy interesantes para el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos, médicos, bioquímicos, industriales, agrícolas etc.

En esta tesis se realizó el estudio de las bacterias resistentes a la desecación intracelular o Xerófilos (*Escherichia coli*, *Streptomyces asenjonii* (Goodfellow *et al.*, 2017), *Arthrobacter sp.* Y *Bacillus sp.* (Maza *et al.*, 2019)), las cuales desempeñan un papel clave en la rizosfera de las plantas proporcionando un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas que las contienen en sus raíces Figura 1. Los microorganismos en la rizosfera (zona de interacción única y dinámica entre raíces de las plantas y microorganismos del suelo), cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Yadav *et al.*, 2015). Uno de los mecanismos por el cual estas bacterias han sido exitosas ante los ambientes extremos es mediante la síntesis de trehalosa (Figura 3), un disacárido que reduce la pérdida de agua de manera intracelular protegiendo de esta forma todas las funciones que dirigen la vida de la bacteria. Particularmente en esta tesis trabajamos con la bacteria *Escherichia coli* (Figura 6), la cual presenta varios mecanismos para la síntesis de trehalosa, el mecanismo que abordamos en este trabajo de tesis utiliza las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa 6 fosfato fosfatasa para generar una molécula de trehalosa y fosforo inorgánico Figura 4. La trehalosa es capaz de generar con sus grupos OH (presentes en sus anillos glucopiranosidos) interacciones no covalentes tipo enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua que la rodean Figura 3, formando redes cristalinas o vítreas (Olsson *et al.*, 2016) que reducen de manera importante la pérdida de agua de manera intracelular, una ventaja adaptativa que presentan los microorganismos

xerotolerantes de los que no lo son, los cuales simplemente no sobreviven ante estas condiciones extremas de la desecación.

Constantemente hay un progreso de las metodologías para determinar las estructuras 3D de las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc), a nivel atómico como: La Difracción de rayos X (Determina la estructura tridimensional de las proteínas utilizando los Rayos X sobre cristales de estas macromoléculas) (Günther *et al.*, 2021; Huxford, 2013; Su *et al.*, 2016; Vénien-Bryan *et al.*, 2017) resonancia magnética nuclear o RMN (Ishima y Torchia, 2000) (Determina la estructura tridimensional de las proteínas en solución usando la información de los núcleos de los átomos sometidos a campos magnéticos) y Crio-Microscopía Electrónica o CRYO-EM (Binshtein & Ohi, 2015) (Determina la estructura tridimensional de las proteínas sometidas a temperaturas criogénicas utilizando los Rayos X). Toda esta gran cantidad de información estructural, formada por las técnicas mencionadas con anterioridad es depositada en el banco de datos de proteínas o PDB (*Protein Data Bank*) (Berman *et al.*, 2002) que hasta hoy Julio del año 2021 tiene 179548 estructuras depositadas.

Con el enorme desarrollo del poder de computo a nivel mundial, se han generado super computadoras capaces de manejar una gran información y obtener resultados en menor tiempo, conforme pase el tiempo esto continuará mejorando y aunado a la creciente facilidad de acceso a las bases de datos como el PDB, surge el modelado estructural de las macromoléculas como otra valiosa fuente de información, permitiendo generar modelos estructurales a nivel atómico a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de las cuales no existe su estructura tridimensional depositada en el PDB. Con la ayuda de diferentes programas de modelado de proteínas por ejemplo I-TASSER (Zheng *et al.*, 2019), PHYRE (Kelley *et al.*, 2015), etc, los investigadores de biología estructural son capaces de generar modelos tridimensionales a partir de la secuencia primaria de aminoácidos generando nuevos modelos basados en homología utilizando la información de las estructuras depositadas en el PDB que tengan un porcentaje de identidad según el programa empleado (Baig & Khaleeq, 2020; Chandrakanth *et al.*, 2020; Sarkar & Saha, 2020; Vargas-Jaimes *et al.*, 2021).

Debido a la ausencia de una estructura depositada en el PDB de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa de *Escherichia coli* y del hecho de que podemos generar un modelo estructural basado en homología, nuestro trabajo toma gran relevancia.

Utilizamos el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) ya que presenta varias características importantes: usa un porcentaje de identidad de al menos 30% entre tu secuencia y el templado del PDB para generar el modelo atómico, es de acceso libre, es pionero en el campo del modelado automatizado desde hace más de 25 años, la función de QMEAN evalúa la calidad del modelo a escala global y local (Benkert *et al.*, 2011). La información generada de las coordenadas iniciales de SWISS-MODEL, es utilizada por el programa: CHARMM-GUI (*Chemistry and Harvard Molecular Mechanics*) (S. Kim *et al.*, 2017), utilizando el campo de fuerza CHARMM-35 de todos los átomos de la proteína en una caja de agua virtual hidratando la molécula generada por el programa CHARMM-GUI, adicionando los átomos de hidrogeno (que no son puestos por la Cristalografía y Difracción de Rayos X), además adicionas el buffer y pH simulando las condiciones en las que se encontraría la proteína globular en solución, generando un nuevo modelo (S. Kim *et al.*, 2017). Los archivos de salida de CHARMM-GUI de este nuevo modelo son tomados por el último programa de este proceso llamado GROMACS (*GROningen Machine for Chemical Simulations*), el cual mediante ciclos de simulación, es capaz de quitar los choques estéricos que presentan algunos átomos en el nuevo modelo, pudiendo afectar los análisis estructurales en la interpretación del modelo final, el cual se encuentra en el mínimo energético de la proteína o la estructura nativa que es la biológicamente funcional (Pronk *et al.*, 2013). Finalmente, los modelos generados por SWISS-MODEL, CHARMM-GUI y GROMACS fueron visualizados por PyMOL (sistema de visualización molecular), analizando las regiones estructurales de interés (Mooers, 2020; Cheng y Li, 2020). El mismo procedimiento fue generado para las mutantes de trehalosa fosfatasa.

Los modelos generados por los predictores basados en homología no solo nos generan modelos estructuralmente muy similares a los plegamientos que tienen las estructuras depositadas de las cuales fueron originados, sino también podemos analizar su función en presencia ausencia de sustratos o inhibidores, importantes para el funcionamiento de muchas proteínas, como se ha observado en otros sistemas: Betalactamasas (enzima capaz de inactivar antibióticos de la familia de los betalactámicos) (Dellus-Gur *et al.*, 2015), Triosa fosfato

isomerasa (enzima glucolítica que cataliza la interconversión entre Dihidroxiacetona fosfato y Gliceraldehído 3-fosfato) (Lee et al., 2017), presencia de átomos de Cu^{2+} (Lacasas) (enzimas pertenecientes al grupo de oxidasas de cobre azul) (Kallio et al., 2011), presencia de iones como Mg^{2+} y Zn^{2+} Fosfatasas alcalinas (Holtz et al., 1999), Mg^{2+} (Taq polimerasa) (DNA polimerasa termoestable) (Kropp et al., 2018), presencia de carbohidratos (Anticuerpos) (glucoproteínas para la defensa del huésped) (Bharathkar et al., 2020), etc. Ya que podemos analizar si existen estas proteínas solas o con complejos en el PDB. Para que un modelo tenga mayor impacto en la investigación es fundamental que existan o se realicen varios experimentos por diferentes técnicas como: Dispersión dinámica de luz o DLS (mide los oligómeros de una proteína con alto grado de pureza en solución), cromatografía de afinidad por tag de Histidinas (purifica proteínas por cromatografía de afinidad), cromatografía de exclusión molecular (purifica proteínas por peso molecular), electroforesis en geles de SDS-PAGE (separa proteínas por carga negativa y nos permite ver el grado de pureza), Difracción de rayos X (determina la estructura tridimensional de una proteína a nivel atómico contenida en un cristal), etc, para que el modelo generado este apoyado por estos datos experimentales. En esta tesis realizamos la generación de un modelo de la fosfatasa de *E. coli* y al mismo tiempo usamos dos estrategias para la generación y validación de los modelos de sus mutantes en el sitio activo. Para la generación del modelo por SWISS-MODEL de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* se utilizó la estructura de la trehalosa fosfatasa depositada en el PDB código: (6UPD) presente en *Salmonella typhimurium* en complejo con la molécula de trehalosa, la estructura de *Salmonella typhimurium* presentó características muy importantes como: un porcentaje de identidad de secuencia muy alto de 72.93 %, una cobertura de 0.83, el método por el que fue resulta la estructura fue difracción de rayos X a una resolución de 2.1 Å su estado de oligomerización es un monomérico y existen estructuras de la fosfatasa sin trehalosa, en complejo con trehalosa o con inhibidor, todas estas características son muy importantes y nos permitieron generar un buen modelo en SWISS-MODEL de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* y de sus mutantes, los modelos generados fueron tratados por los programas CHARMM-GUI y GROMACS para la generación de los modelos finales, los cuales tienen todos sus átomos incluyendo los de hidrógeno, que no pone la difracción de rayos X, además en los modelos finales de GROMACS ya no presentan sus aminoácidos impedimentos estéricos o malas rotaciones en sus cadenas

laterales, lo cual fue logrado a través de varios pasos de minimización, hasta llegar a la conformación energéticamente más estable, se pueden realizar los análisis estructurales con las estructuras depositadas en el PDB de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* con trehalosa y con inhibidor códigos de PDB: (6UPD) y (6UPE) respectivamente.

Para la generación de los modelos de las mutantes de fosfatasa la primera estrategia fue hacer un análisis en Clustal Omega de múltiples secuencias de fosfatasa de diferentes especies para analizar la presencia de mutaciones en los aminoácidos del sitio activo seleccionadas de manera natural. Durante la búsqueda de las secuencias de la trehalosa fosfatasa en formato FASTA en el NCBI (National Center for Biotechnology Information), identificamos 44 secuencias de fosfatasas en diferentes microorganismos: bacterias (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii*, etc) (número de acceso de Genbank o ver el número de acceso en la Figura 22) y organismos como: plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, etc), entre otros. Analizamos los aminoácidos que componen el sitio activo: D20, L21, D22, S60, E123, K125 y K175, los cuales están conservados en la mayoría de las secuencias del alineamiento Figura 22, de manera importante para el caso de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*: *SpTPS5* su fosfatasa presenta una mutación en solo uno de los aminoácidos del sitio activo y está localizada en la posición del Asp 20 cambiado a Asn (D20N), lo cual implica la pérdida de una carga parcial negativa presente en el Asp, esta mutación entonces implica que no se estabiliza la carga positiva del ion Mg^{2+} y se disminuye la actividad enzimática, de manera importante la pérdida del aminoácido que hace el ataque nucleofílico formaría una enzima inactiva (Thammahong *et al.*, 2017), la otra secuencia en este alineamiento que presenta otra mutación muy relevante se encontró en otro aminoácido del sitio activo y en este caso está presente en el hongo: *E. gossypii*-3 la mutación ocurrió en la posición del Asp 22 mutado a Glu (D22E) y aquí hay una conservación de carga negativa y la generación de un -CH₂- presente en el Glutámico o E. También generamos una mutación en otro aminoácido del sitio activo: Lys 145 por Arg (K145R) en donde hay una conservación de carga positiva y la generación del grupo guanidinio.

Una vez obtenidas y seleccionadas las mutaciones del alineamiento múltiple la segunda estrategia fue generar los modelos para cada mutante de la trehalosa fosfatasa de *E. coli* empleando los servidores: SWISS-MODEL, CHARMM-GUI y GROMACS evaluando sus

parámetros de cada servidor, utilizando como templado la estructura de la fosfatasa de *Salmonella typhimurium* con trehalosa código de PDB: (6UPD), en esta estructura presentamos los aminoácidos del sitio activo que involucran la unión con el disacárido **Figura 30**.

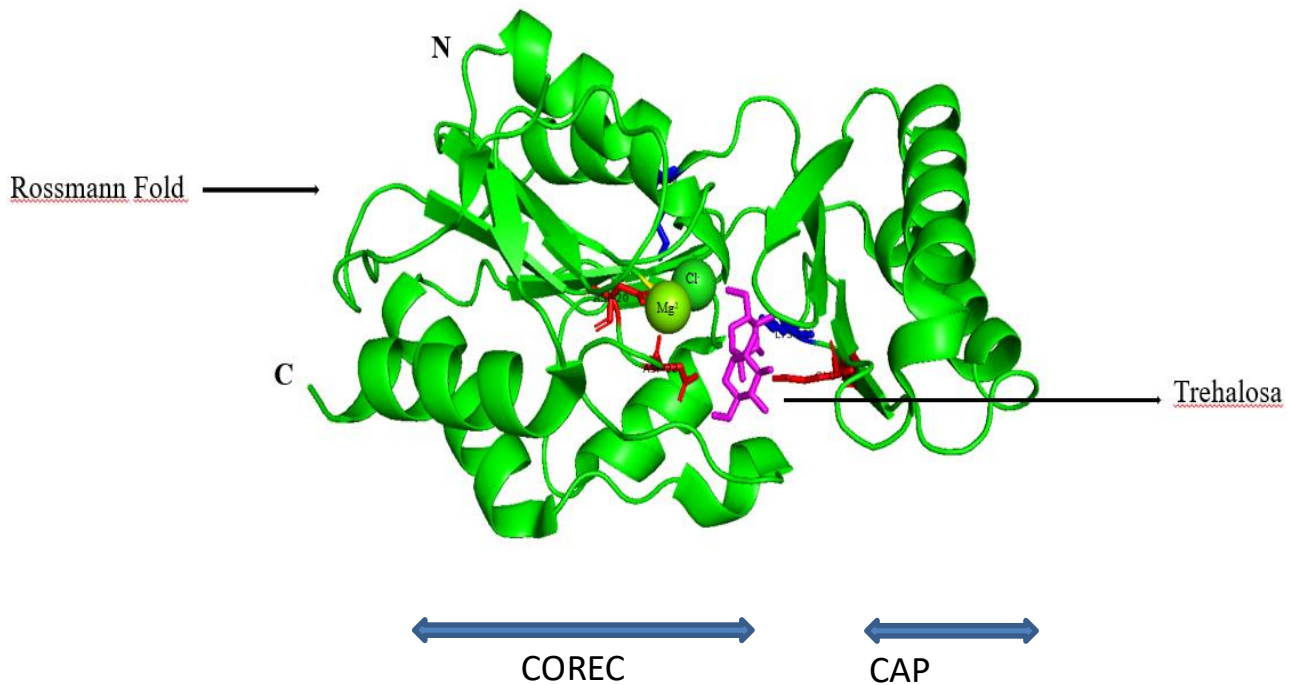


Figura 30. Vista lateral de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* código de PDB (6UPD), formada por un dominio Rossmann Fold en el centro están las hebras beta rodeadas por alfa hélices (color verde), la trehalosa está en color morado, se muestran los extremos N y C-terminal (letras negras), los aminoácidos del sitio activo están en color rojo, amarillo y azul, los iones de Mg²⁺ y Cl⁻ son esferas de color verde, los dominios Core y Cap (flechas azul), visualizados por PyMOL.

La estructura tridimensional de la fosfatasa de *Salmonella typhimurium* es un plegamiento Rossmann Fold, formado en el centro por hebras β rodeadas por α -hélices (dominio CORE), a la derecha se encuentran 4 hebras- β rodeadas por 2 α -hélices (dominio CAP), entre ambos

dominios se encuentra situada la molécula de trehalosa, están los aminoácidos del sitio activo: D20, L21, D22, S60, E123, K125 y K175 (los aminoácidos negativos en color rojo, los polares en amarillo y los positivos en color azul), también destacan los iones de Mg^{2+} y Cl^- en la estructura. Al calcular el RMSD de esta estructura con el modelo de la fosfatasa de *E. coli* generada por GROMACS nos dio 0.082395 sobre 240 residuos esto refleja que son muy similares estructuralmente **Figura 31**.

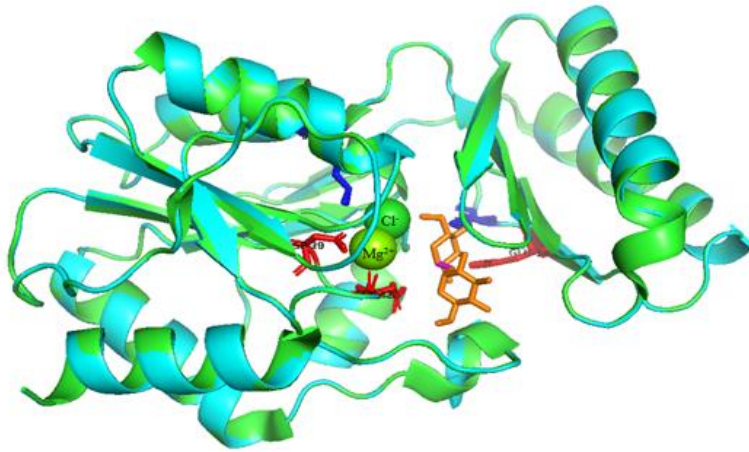


Figura 31. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD (verde), con el modelo tridimensional de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* (cyan), el dominio Rossmann Fold (verde-cyan), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillo, rojo y azul), la molécula de trehalosa (anaranjado), los átomos de Mg^{2+} y Cl^- esferas (verde) generado por PyMOL.

Al realizar la superposición de la estructura de *Salmonella* con los modelos de las mutantes generadas de la fosfatasa de *E. coli*, el análisis para la primera mutante de Asp 20 cambiado a Asn (D20N) Figura 29, este es el aminoácido que hace el ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato de la Trehalosa-6-fosfato, el cual al ser mutado en *E. coli* probablemente daría una enzima inactiva, esto fue demostrado en la fosfatasa de hongos (Thammahong *et al.*, 2017). La

mutación puntual de D20N implica la pérdida de una carga parcial negativa presente en el Asp que no tiene la Asn.

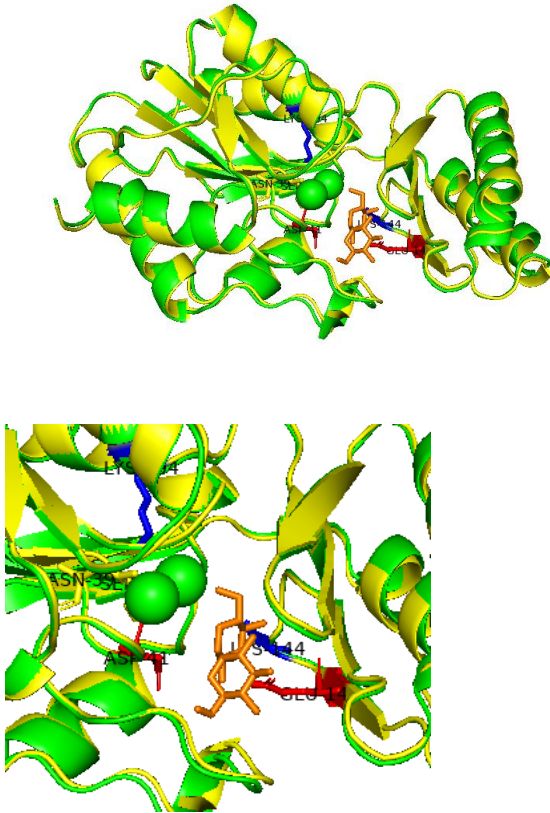


Figura 32. Superposición de la estructura de *Salmonella* código: 6UPD con el modelo de la mutante D20N a), y un acercamiento de los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillos, rojos y azules) de ambas enzimas, la molécula de trehalosa (anaranjado), la mutación D20N (amarillo) en letras negras as visualizadas por PyMOL en b).

Al realizar la superposición de la estructura de *Salmonella* con el modelo de la segunda mutación puntual, fue el Asp 22 por Glu (D22E) **Figura 33**, aunque es una mutación conservada ya que involucra aminoácidos negativos, la presencia de un -CH₂- de más en la cadena lateral

(grupo R) en el Glutámico o E, le permitiría un mejor acercamiento con los átomos de la trehalosa, formando interacciones a menor distancia, existen varios reportes de estas mismas mutaciones presentes en los sitios activos de varias enzimas de otros organismos y ésta demostrado que se mejora la Km o la Vmax (Fiser *et al.*, 1996; Hou *et al.*, 2001; Kukreja *et al.*, 2007; Perelle *et al.*, 1996; Wojciechowski y Kantrowitz, 2003).

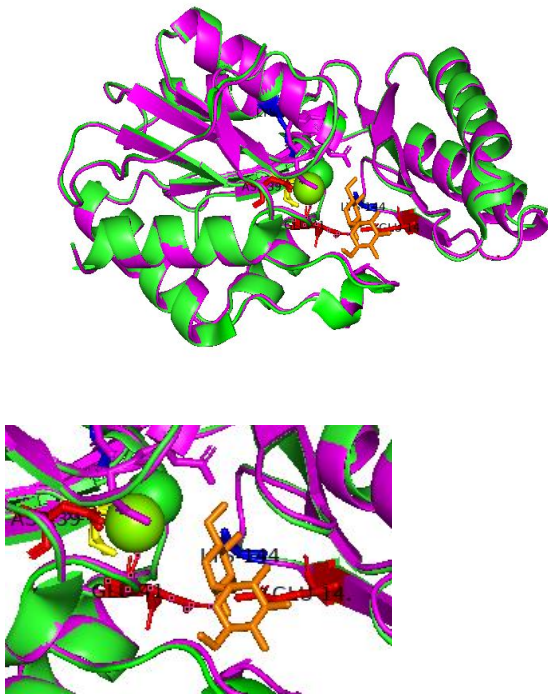


Figura 33. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD (verde), con el modelo tridimensional de la mutante D22E de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* (violeta), el dominio Rossmann Fold (verde y violeta), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillo, rojo y azul), la molécula de trehalosa (anaranjado), los átomos de Mg²⁺ y Cl⁻ esferas (verde) generado por PyMOL a) y b) un acercamiento de los aminoácidos del sitio activo destacando la mutación D22E (color rojo) letras negras.

Al realizar la superposición de la estructura de *Salmonella* con el modelo de la tercera mutación puntual en el sitio activo de la fosfatasa de *E. coli*, en la Lys 125 por Arg (K125R) **Figura 34**, en donde hay una conservación de carga positiva y la generación del grupo guanidinio, este grupo

presente en la cadena lateral de la R, podría formar nuevas interacciones con átomos de la molécula de trehalosa, también se ha demostrado que esta mutación ha sido probada en los sitios activos de otras enzimas encontrando que incrementan la K_m o la V_{max} (Allert y Baltzer, 2002; Schepens *et al.*, 2000; Silva-Junior *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018).

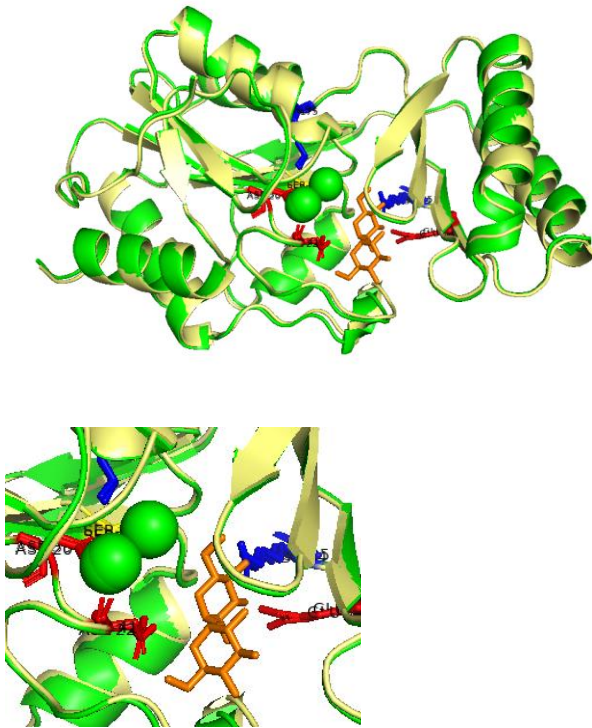


Figura 34. Superposición de la estructura de la trehalosa fosfatasa de *Salmonella typhimurium* PDB: 6UPD (verde), con el modelo tridimensional de la mutante K125R de la Trehalosa-fosfatasa de *Escherichia coli* (oro), el dominio Rossmann Fold (verde y oro), los aminoácidos del sitio activo en colores (amarillo, rojo y azul), la molécula de trehalosa (anaranjado), los átomos de Mg^{2+} y Cl^- esferas (verde) generado por PyMOL a) y b) un acercamiento de los aminoácidos del sitio activo desacando la K125R (color azul) letras negras.

Con el continuo crecimiento del PDB, así como de los modeladores como: SWISS-MODEL esta combinación ha sido muy exitosa para el análisis funcional de muchas estructuras de proteínas y modelos basados en homología de las mismas (Baig y Khaleeq, 2020; Chandrakanth *et al.*, 2020; Sarkar & Saha, 2020; Vargas-Jaimes *et al.*, 2021). Esto nos permitió generar en esta tesis un análisis estructural basado en estructuras depositadas en el PDB y así como la generación

de modelos de la fosfatasa de *E. coli* silvestre y tres mutantes, las cuales generaron una información valiosa que debería ser demostrada de manera experimental.

CONCLUSIONES

1. Generamos un modelo tridimensional por SWISS-MODEL basado por homología de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli*, a partir de la estructura depositada en el PDB de *Salmonella typhimurium* PDB (6UPD), que presenta un plegamiento Rossmann Fold de lámina beta rodeada por hélices alfa y en el sitio activo está unido a una molécula de trehalosa.
2. Realizamos un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de las fosfatasas de diferentes microorganismos (bacterias) y organismos (plantas, hongos, etc), pudiendo encontrar mutaciones en aminoácidos que componen el sitio activo de la enzima.
3. La mutación de D20N podría afectar el funcionamiento de la enzima debido a la pérdida de la carga negativa que presenta el ácido Aspártico (D) en su cadena lateral, la cual estabiliza la carga positiva del ion magnesio (Mg^{2+}), como se observa en la estructura de *Salmonella typhimurium* códigos de PDB (6UPD y 6UPE).
4. La mutación de D22E podría mantener o mejorar la actividad de la enzima, debido a un carbono de más, presente en la cadena lateral del Glutámico (E), manteniendo la carga negativa que presenta el Aspártico (D) en su cadena lateral, como se observa en la estructura de *Salmonella typhimurium* código de PDB (6UPD).
5. La mutación de K145R podría mantener o mejorar la actividad de la enzima, debido a que los átomos de su cadena lateral de la Arg o R podrían formar nuevas interacciones no covalentes con los grupos OH de la molécula de trehalosa manteniendo la carga positiva que presenta la K145.

PERSPECTIVAS

1. Diseñar y clonar los genes de la trehalosa fosfatasa de *Escherichia coli* y sus mutantes, en plásmidos de expresión con colas de Histidinas en cepas de *E. coli*.
2. Purificación de las enzimas por diferentes cromatografías, analizar el grado de pureza en Geles de SDS-PAGE 12% con DTT y cuantificación de la concentración de proteína.
3. Medir *in vitro* la actividad enzimática de trehalosa fosfasa silvestre en la producción de trehalosa con respecto a la producción de la trehalosa que generen las mutantes.
4. Clonar los genes de *Escherichia coli* de las enzimas sintetasa y fosfatasa, esta última silvestre o mutante, en cepas bacterianas que no son xerotolerantes.
5. Analizar y comparar el crecimiento de las plantas que tengan las nuevas cepas xerotolerantes, con el crecimiento de las plantas con cepas que no son xerotolerantes.
6. Generar el modelo de la doble mutante D22E y K125R.
7. Clonar su gene y caracterizar la proteína.

REFERENCIAS

1. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 36,1-9
2. Allert, M., & Baltzer, L. (2002). Setting the stage for new catalytic functions in designed proteins--exploring the imine pathway in the efficient decarboxylation of oxaloacetate by an Arg-Lys site in a four-helix bundle protein scaffold. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 8(11), 2549–2560. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20020603\)8:11<2549::AID-CHEM2549>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20020603)8:11<2549::AID-CHEM2549>3.0.CO;2-X)
3. Baig, A. M., & Khaleeq, A. (2020). First Reports of Effects of Insulin, Human-like Insulin Receptors and Adapter Proteins in *Acanthamoeba castellanii*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63435-4>
4. Bawono, P., Dijkstra, M., Pirovano, W., Feenstra, A., Abeln, S., & Heringa, J. (2017). Multiple Sequence Alignment. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1525, 167–189. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_8
5. Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
6. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., & Zardecki, C. (2002). The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(6 I), 899–907. <https://doi.org/10.1107/S0907444902003451>
7. Bharathkar, S. K., Parker, B. W., Malyutin, A. G., Haloi, N., Huey-Tubman, K. E., Tajkhorshid, E., & Stadtmueller, B. M. (2020). The structures of secretory and dimeric immunoglobulin a. *ELife*, 9, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.56098>
8. Binshtein, E., & Ohi, M. D. (2015). Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution. *Biochemistry*, 54(20), 3133–3141.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00114>

9. Blanco, A., & Blanco, G. (2017). *Chapter 3 - Proteins* (A. Blanco & G. B. T.-M. B. Blanco (eds.); pp. 21–71). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00003-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00003-3)
10. Chanway, C.P., R.K. Hynes y L.M. Nelson. 1989. Plant growth promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench.) and pea (*Pisum sativum* L.). *Soil Biol. Biochem.* 21: 511-517.
11. Chakrabortee S, Boschetti C, Walton L, Sovan S, Rubinsztein D, Tunnacliffe A, (2007) Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (46) 18073-18078.
12. Clegg JS (2001). Cryptobiosis-a peculiar state of biological organization. *Comp. Biochem. Physiol.* 128: 613-624
13. Couillerot O, Ramírez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J., (2013) Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4639-49.
14. Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., and Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
15. Chandrakanth, R., Sunil, L., Sadashivaiah, L., & Devaki, N. S. (2020). In silico modelling and characterization of eight blast resistance proteins in resistant and susceptible rice cultivars. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00076-0>
16. Cheng, B., & Li, T. (2020). Discovery of alliin as a putative inhibitor of the main protease of SARS-CoV-2 by molecular docking. *BioTechniques*, 69(2), 108–112. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0038>
17. Cuff, J. A., & Barton, G. J. (2000). Application of multiple sequence alignment profiles to

improve protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 40(3), 502–511. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20000815\)40:3<502::AID-PROT170>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0134(20000815)40:3<502::AID-PROT170>3.0.CO;2-Q)

18. Dellus-Gur, E., Elias, M., Caselli, E., Prati, F., Salverda, M. L. M., de Visser, J. A. G. M., Fraser, J. S., & Tawfik, D. S. (2015). Negative Epistasis and Evolvability in TEM-1 β -Lactamase—The Thin Line between an Enzyme's Conformational Freedom and Disorder. *Journal of Molecular Biology*, 427(14), 2396–2409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.05.011>
19. Demoulin, C. F., Lara, Y. J., Cornet, L., François, C., Baurain, D., Wilmotte, A., & Javaux, E. J. (2019). Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology & Medicine*, 140, 206–223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.007>
20. Di Benedetto, N. A., Corbo, M. R., Campaniello, D., Cataldi, M. P., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Flagella, Z. (2017). The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. *AIMS Microbiology*, 3(3), 413–434. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
21. Dong, Y., Sanford, R. A., Boyanov, M. I., Kemner, K. M., Flynn, T. M., O'Loughlin, E. J., Chang, Y.-J., Locke Jr, R. A., Weber, J. R., Egan, S. M., Mackie, R. I., Cann, I., & Fouke, B. W. (2016). *Orenia metallireducens* sp. nov. Strain Z6, a Novel Metal-Reducing Member of the Phylum Firmicutes from the Deep Subsurface. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6440–6453. <https://doi.org/10.1128/AEM.02382-16>
22. Döbbelaere S A, Croonenborghs A, Thys D, Ptacek J, Vanderleyden P, Dutto C, Labandera-González J, Caballero-Mellado J, Francisco-Aguirre Y, Kapulnik S, Brenn S, Burdman D, Kadouri S, Varig y Y. Okon.(2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant. Physiol.* 28,871-879.
23. Duque E , Marqués S , Ramos J L . (1993). Mineralization of p-methyl-¹⁴C-benzoate in soils by *Pseudomonas putida* (pWW0). *Microbial releases*, 7, 175.
24. Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high

throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

25. Efthimiadou, A., Katsenios, N., Chanioti, S., Giannoglou, M., Djordjevic, N., & Katsaros, G. (2020). Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on growth, physiology, yield and seed quality of maize under Mediterranean conditions. *Scientific Reports*, 10(1), 21060. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78034-6>
26. Fiser, A., Simon, I., & Barton, G. J. (1996). Conservation of amino acids in multiple alignments: Aspartic acid has unexpected conservation. *FEBS Letters*, 397(2–3), 225–229. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01181-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01181-7)
27. George, R. A., & Heringa, J. (2002). Protein domain identification and improved sequence similarity searching using PSI-BLAST. *Proteins*, 48(4), 672–681. <https://doi.org/10.1002/prot.10175>
28. Galli E, Silver S, Wiltholt B. (1992). *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington.
29. García A. (2011). Anhydrobiosis in bacteria: From physiology to applications. *Journal of biosciences*. 36. 939-50.
30. Garg A K, Kim J K, Owens TG, Ranwala A P, Choi Y D, Kochian L V, Wu R J (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15898- 15903.
31. Griffin, D.M. (1981). Water microbial stress .*Adv. Microbial Ecol.* 5, 91-136.
32. Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R (2012) Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotechnol.* 14: 182-90
33. Goodfellow, M., Busarakam, K., Idris, H., Labeda, D. P., Nouioui, I., Brown, R., Kim, B.-Y., Del Carmen Montero-Calasanz, M., Andrews, B. A., & Bull, A. T. (2017). *Streptomyces asenjonii* sp. nov., isolated from hyper-arid Atacama Desert soils and emended

description of *Streptomyces viridosporus* Pridham et al. 1958. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0886-7>

34. Harvey, C. M., O'Toole, K. H., Liu, C., Mariano, P., Dunaway-Mariano, D., & Allen, K. N. (2020). Structural Analysis of Binding Determinants of *Salmonella typhimurium* Trehalose-6-phosphate Phosphatase Using Ground-State Complexes. *Biochemistry*, 59(35), 3247–3257. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00317>
35. Hibshman, J. D., Clegg, J. S., & Goldstein, B. (2020). Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades. *Frontiers in Physiology*, 11, 592016. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.592016>
36. Holtz, K. M., Stec, B., & Kantrowitz, E. R. (1999). A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8351–8354. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8351>
37. Hou, Y., Vocadlo, D. J., Leung, A., Withers, S. G., & Mahuran, D. (2001). Characterization of the Glu and Asp residues in the active site of human β -hexosaminidase B. *Biochemistry*, 40(7), 2201–2209. <https://doi.org/10.1021/bi002018s>
38. Ishima, R., & Torchia, D. A. (2000). Protein dynamics from NMR. *Nature Structural Biology*, 7(9), 740–743. <https://doi.org/10.1038/78963>
39. Ivanova, N., Sikorski, J., Chertkov, O., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Huntemann, M., Liolios, K., Pagani, I., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., ... Lapidus, A. (2011). Complete genome sequence of the extremely halophilic *Halanaerobium praevalens* type strain (GSLT). *Standards in Genomic Sciences*, 4(3), 312–321. <https://doi.org/10.4056/sigs.1824509>
40. Kallio, J. P., Rouvinen, J., Kruus, K., & Hakulinen, N. (2011). Probing the dioxygen route in *Melanocarpus albomyces* laccase with pressurized xenon gas. *Biochemistry*, 50(21), 4396–4398. <https://doi.org/10.1021/bi200486b>

41. Kizawa, Hideki & Miyazaki, Jun-Ichi & Yokota, Akira & Kanegae, Yukihiro & Miyagawa, Ken-Ichiro & Sugiyama, Yoshio. (1995). Trehalose Production by a Strain of *Micrococcus varians*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry BIOSCI BIOTECHNOL BIOCHEM.* 59. 1522-1527. 10.1271.
42. Kloepper J W , Lifshitz R, Zablotowicz R M, (1989) Free- living bacterial inocula for enhancing crop productivity. 7:39-44.
43. Kotzia, G.A.; Labrou, N.E. Engineering thermal stability of Lasparaginase by in vitro directed evolution. *FEBS J.*, 2009, 276, 1750-1761.
44. Kuiper I, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2001) Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14,1197–1205
45. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
46. Kim, S., Lee, J., Jo, S., Brooks 3rd, C. L., Lee, H. S., & Im, W. (2017). CHARMM-GUI ligand reader and modeler for CHARMM force field generation of small molecules. *Journal of Computational Chemistry*, 38(21), 1879–1886. <https://doi.org/10.1002/jcc.24829>
47. Kim, W., & Whitman, W. B. (2014). *Methanogens* (C. A. Batt & M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello (eds.); pp. 602–606). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00204-4>
48. Kosar, F., Akram, N. A., Sadiq, M., Al-Qurainy, F., & Ashraf, M. (2019). Trehalose: A Key Organic Osmolyte Effectively Involved in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 606–618. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9876-x>
49. Kropp, H. M., Dürr, S. L., Peter, C., Diederichs, K., & Marx, A. (2018). Snapshots of a modified nucleotide moving through the confines of a DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), 9992–9997.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1811518115>

50. Kukreja, R. V., Sharma, S., Cai, S., & Singh, B. R. (2007). Role of two active site Glu residues in the molecular action of botulinum neurotoxin endopeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(2), 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.11.007>
51. Lee, Y., Nishizawa, T., Takemoto, M., Kumazaki, K., Yamashita, K., Hirata, K., Minoda, A., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Ishitani, R., & Nureki, O. (2017). Structure of the triose-phosphate/phosphate translocator reveals the basis of substrate specificity. *Nature Plants*, 3(10), 825–832. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0022-8>
52. Liu, Q., Liu, H.-C., Zhou, Y.-G., & Xin, Y.-H. (2019). Microevolution and Adaptive Strategy of Psychrophilic Species *Flavobacterium bomense* sp. nov. Isolated From Glaciers. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1069. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01069>
53. Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63,541–556.
54. Leisinger T,(1983). Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39, 1183-1191
55. Linn D M, Doran J W, . (1984). Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 48, 1267-1272.
56. Malusa E., Vassilev N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6599–6607
57. Martínez-Bueno M A , Tobes R , Rey M , Ramos J L. (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* 4, 842–855

58. Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., Ramos, J.L. (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* 32, 315–321
59. Molina-Romero D, Bustillos-Cristales M D R , Rodriguez-Andrade O, Morales-Garcia Y E, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M.(2015)Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y Potencial biotecnológico. *Biologicas* 17:24-34
60. Morales-Garcia YE, Juarez-Hernandez D, Aragon-Hernandez C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, Fuentes- Ramirez LE, Martinez-Contreras RD, Munoz-Rojas J. (2011) Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol* 43: 287-293.
61. Maza, F., Maldonado, J., Vásquez-Dean, J., Mandakovic, D., Gaete, A., Cambiazo, V., & González, M. (2019). Soil Bacterial Communities From the Chilean Andean Highlands: Taxonomic Composition and Culturability. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00010>
62. Mooers, B. H. M. (2020). Shortcuts for faster image creation in PyMOL. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 29(1), 268–276. <https://doi.org/10.1002/pro.3781>
63. Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
64. Olsson, C., Jansson, H., & Swenson, J. (2016). The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(20), 4723–4731. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02517>
65. Pandey, S., & Gupta, S. (2020). Evaluation of *Pseudomonas* sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Scientific Reports*, 10(1), 20951. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77850-0>

66. Papendick RI., Campbell GS. (1981) Theory and measurement of water potential. In: Parr JF.
67. Plückthun, A.; Schaffitzel, C.; Hanes, J.; Jermutus, L. In vitro selection and evolution of proteins. *Adv. Protein Chem.*, 2001, 55, 367-403.
68. Pazos-Rojas, Laura Abisaí, Muñoz-Arenas, L. C., Rodríguez-Andrade, O., López-Cruz, L. E., López-Ortega, O., Lopes-Olivares, F., Luna-Suarez, S., Baez, A., Morales-García, Y. E., Quintero-Hernández, V., Villalobos-López, M. A., De la Torre, J., & Muñoz-Rojas, J. (2019). Desiccation-induced viable but nonculturable state in *Pseudomonas putida* KT2440, a survival strategy. *PloS One*, 14(7), e0219554–e0219554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219554>
69. Pazos-Rojas, Laura Abisai, Muñoz Arenas, L., Chávez-Ortiz, M., Morales-García, Y., Bustillos, M., Toribio-Rosales, C., & Muñoz-Rojas, J. (2007). *RESISTENCIA DE PSEUDOMONAS PUTIDA KT2440 A LA DESECACIÓN*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13586.81608>
70. Perelle, S., Domenighini, M., & Popoff, M. R. (1996). Evidence that Arg-295, Glu-378, and Glu-380 are active-site residues of the ADP-ribosyltransferase activity of iota toxin. *FEBS Letters*, 395(2–3), 191–194. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01035-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01035-6)
71. Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5–6), 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
72. Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., & Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(7), 845–854. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>

73. Rumjanek NG, Dobert RC, van Berkum P, Triplett EW (1993). Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4371-73.
74. Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
75. Sarkar, M., & Saha, S. (2020). Structural insight into the role of novel SARSCoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies. *PLoS ONE*, 15(8 August), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237300>
76. Schepens, I., Ruelland, E., Miginiac-Maslow, M., Le Marechal, P., & Decottignies, P. (2000). The role of active site arginines of sorghum NADP-malate dehydrogenase in thioredoxin-dependent activation and activity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35792–35798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006526200>
77. Sethi, R., Iyer, S. S., Das, E., & Roy, I. (2018). Discrete roles of trehalose and Hsp104 in inhibition of protein aggregation in yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 18(6). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy058>
78. Sievers, F., & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
79. Silva-Junior, F. P., Guedes, H. L. M., Garvey, L. C., Aguiar, A. S., Bourguignon, S. C., Di Cera, E., & Giovanni-De-Simone, S. (2007). BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon*, 50(1), 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.018>
80. Simossis, V. A., & Heringa, J. (2005). PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W289–W294. <https://doi.org/10.1093/nar/gki390>

81. Singh, N., Rai, S. N., Singh, V., & Singh, M. P. (2020). Molecular characterization, pathogen-host interaction pathway and in silico approaches for vaccine design against COVID-19. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 110, 101874. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101874>
82. Tapia, H., Young, L., Fox, D., Bertozzi, C. R., & Koshland, D. (2015). Increasing intracellular trehalose is sufficient to confer desiccation tolerance to *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), 6122–6127. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506415112>
83. Thammahong, A., Puttikamonkul, S., Perfect, J. R., Brennan, R. G., & Cramer, R. A. (2017). Central Role of the Trehalose Biosynthesis Pathway in the Pathogenesis of Human Fungal Infections: Opportunities and Challenges for Therapeutic Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 81(2), e00053-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-16>
84. Todeschini, V., AitLahmidi, N., Mazzucco, E., Marsano, F., Gosetti, F., Robotti, E., Bona, E., Massa, N., Bonneau, L., Marengo, E., Wipf, D., Berta, G., & Lingua, G. (2018). Impact of Beneficial Microorganisms on Strawberry Growth, Fruit Production, Nutritional Quality, and Volatilome. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1611. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01611>
85. Vargas-Jaimes, L., Rodriguez, M. C., Argotte-Ramos, R., Juárez-González, V. R., Pastor, N., Cesa-Luna, C., Possani, L. D., & Quintero-Hernández, V. (2021). Recombinant C-Terminal Domains from Scorpine-like Peptides Inhibit the *Plasmodium berghei* Ookinete Development In Vitro. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27(1), 817–829. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10130-7>
86. Vénien-Bryan, C., Li, Z., Vuillard, L., & Boutin, J. A. (2017). Cryo-electron microscopy and X-ray crystallography: Complementary approaches to structural biology and drug discovery. *Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications*, 73(4), 174–183. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17003740>
87. Villas-Boas, G. R., Rescia, V. C., Paes, M. M., Lavorato, S. N., Magalhães-Filho, M. F.

de, Cunha, M. S., Simões, R. da C., Lacerda, R. B. de, Freitas-Júnior, R. S. de, Ramos, B. H. da S., Mapeli, A. M., Henriques, M. da S. T., Freitas, W. R. de, Lopes, L. A. F., Oliveira, L. G. R., Silva, J. G. da, Silva-Filho, S. E., Silveira, A. P. S. da, Leão, K. V, ... Oesterreich, S. A. (2020). The New Coronavirus (SARS-CoV-2): A Comprehensive Review on Immunity and the Application of Bioinformatics and Molecular Modeling to the Discovery of Potential Anti-SARS-CoV-2 Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4086. <https://doi.org/10.3390/molecules25184086>

88. Tenorio-Salgado S, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Caballero-Mellado J, Pérez-Rueda E (2013) Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4:236-43.
89. Van Gestel, M., Ladd, J.N. & Amato, M. (1991) Carbon and Nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and micro aggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage — *Soil Biol. Biochem* 23,313-322.
90. Van Gestel, R., Merckx, K., . (1993). Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast-and slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 109-123.
91. Velivelli S, Sessitsch A, Doyle B, (2014). The Role of Microbial Inoculants in Integrated Crop Management Systems. *Potato Research*.57. 291- 309.
92. Vilchez S., Manzanera M. (2011). Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 1297.
93. Voinnet O. (2005). RNA silencing compared with innate immunity. *Nature Rev Gen* 6,206-220
94. Yadav BK, Akhtar MS, Panwar J (2015) Rhizospheric plant microbe interactions: a key factor to soil fertility and plant nutrition. In: Arora NK *Plant microbe symbiosis—applied facets*. Springer,127–145

95. Yuan, L., Kurek, I., English, J., & Keenan, R. (2005). Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69(3), 373–392.
96. Wang, Yan, Zhang, H., Zhong, H., & Xue, Z. (2021). Protein domain identification methods and online resources. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1145–1153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.041>
97. Wang, Yong, Sadreyev, R. I., & Grishin, N. V. (2009). PROCAIN server for remote protein sequence similarity search. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(16), 2076–2077. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp346>
98. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
99. Wojciechowski, C. L., & Kantrowitz, E. R. (2003). Glutamic acid residues as metal ligands in the active site of Escherichia coli alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1649(1), 68–73. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00156-0)
100. Wu, X., Tian, Z., Jiang, X., Zhang, Q., & Wang, L. (2018). Enhancement in catalytic activity of Aspergillus niger XynB by selective site-directed mutagenesis of active site amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 249–260. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8607-8>
101. Zheng, W., Zhang, C., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2019). I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Future Generations Computer Systems : FGCS*, 99, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.future.2019.04.011>