



Facultad de Medicina

Título de Tesis:
**Identificación de promotores regulados por la proteína
potenciadora TyrR de *Azospirillum brasilense* Sp7**

Para obtener el título de:
Licenciado en Biomedicina

Presenta:
Luis Enrique González Quechol

Asesor Experto:
DC. Beatriz Eugenia Baca

Asesor Metodológico:
DC. Alberto Ramírez Mata

Puebla, 2023

Índice.

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Antecedentes	9
3.1 Antecedentes generales.....	9
3.2 Antecedentes específicos	18
4. Justificación	21
5. Planteamiento del problema	22
6. Hipótesis Científica	22
7. Objetivos	22
7.1 Objetivo General	22
7.2 Objetivos Particulares	22
8. Esquema de trabajo	23
9. Materiales y métodos	23
9.1 Material biológico	23
9.2 Técnicas y procedimientos.....	25
9.2.1 Análisis bioinformático.....	25
9.2.3 Condiciones de cultivo.....	26
9.2.4 Extracción y manipulación de DNA	27
9.2.5 Protocolo de PCR para amplificación de secuencias promotoras pFlgC y pSTAS .	27
9.2.6 Condiciones de cultivo y análisis para ensayos de fluorescencia	27
9.2.7 Ensayo de β -Glucuronidasa.....	28
10. Resultados	28
10.1 Análisis bioinformático de la filogenia del gen TyrR de <i>A. brasilense</i>	29
10.2 Análisis bioinformático de presuntas secuencias promotoras reguladas por TyrR en <i>A. brasilense</i>	32
10.3 Análisis de la región promotora del gen que codifica la proteína varilla del cuerpo basal flagelar FlgC.....	34
10.4 Análisis de la región promotora del gen que codifica para una proteína que contiene el Dominio STAS	35

10.4.1 Diseño de los oligonucleótidos y simulación de las construcciones en el vector pRU1156	36
10.5 Comprobación por PCR de la región codificante de TyrR de la cepa <i>A. brasilense</i> Sp7 (1542 pb) y la cepa mutante <i>A. brasilense</i> 2116 (<i>tyrR</i> minus, 2465 pb).	38
10.6 Comprobación de la presencia de promotores FlgC y STAS clonados en el plásmido pRU1156 en <i>A. brasilense</i> Sp7.....	39
10.7 Comprobación de las construcciones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en <i>A. brasilense</i> Sp7 mediante PCR.....	40
10.8 Extracción de DNA plasmídico por el método del Kit Maxiprep de plásmido Endofree.	41
10.9 Comprobación de la construcción de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en <i>E. coli</i> DH5 α por patrón de restricción	43
10.10 Análisis de la expresión de fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por microcopia de fluorescencia.....	44
10.11 Análisis de la determinación de la β -Glucuronidasa.....	46
11. Discusión	48
12. Conclusiones	51
13. Perspectivas	51
14. Anexo	52
15. Bibliografía	52

Índice de figuras

Figura 1. Organización del dominio de Sigma 54.....	11
Figura 2. Arquitectura de dominio de los cinco grupos clásicos (grupos I a V) de bEBP.	13
Figura 3. Posibles objetivos de la regulación mediada por dominios regulados..	17
Figura 4. Árbol filogenético del género <i>Azospirillum</i> que poseen la proteína reguladora transcripcional TyrR.....	29
Figura 5. Árbol filogenético de 653 bacterias que poseen la proteína reguladora transcripcional TyrR.....	31
Figura 6. Dominios de la proteína FlgC, componente del cuerpo basal del flagelo, en <i>A. brasilense</i> Sp7.....	34
Figura 7. Análisis del presunto promotor para el gen flgC.....	35
Figura 8. Dominio STAS_2 del gen STAS, que codifica para un factor anti-sigma en <i>A. brasilense</i> Sp7.....	35

Figura 9. Análisis de la región promotora del gen STAS que codifica para un factor antisigma (STAS), una proteína que contiene el Dominio STAS.	36
Figura 10. Simulación de las construcciones en el vector pRU1156.	38
Figura 11. Comprobación por PCR de la región codificante de TyrR de la cepa <i>A. brasilense</i> Sp7.....	39
Figura 12. Comprobación de la presencia de promotores FlgC y STAS clonados en el plásmido pRU1156 en <i>A. brasilense</i> Sp7.....	40
Figura 13. Amplificado de los promotores de los genes flgC y STAS con los oligonucleótidos VFF y VFR.....	41
Figura 14. DNA plasmídico de las cepas <i>E. coli</i> DH5 α pRU1156pFlgC (carril 1-5) y <i>E. coli</i> DH5 α pRU1156pSTAS (7-10).....	42
Figura 15. PCR de la presencia de las construcciones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en <i>E. coli</i> DH5 α	43
Figura 16. Comprobación de la construcción de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en <i>E. coli</i> DH5 α por patrón de restricción.	44
Figura 17. Microscopia de fluorescencia para la expresión de la GFP en <i>A. brasilense</i> Sp7 pRUpFlgC y pRUpSTAS.....	45
Figura 18. Microscopia de fluorescencia para la expresión de la GFP en <i>A. brasilense</i> 2116 pRUpFlgC y pRUpSTAS.....	45
Figura 19. Actividad enzimática UE/mg/mL de proteína.....	47

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas, plásmidos y reactivos empleados en este estudio.	23
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la realización del proyecto.....	26
Tabla 3. Tabla de promotores seleccionados implicados en la transducción de señales y/o quimiotaxis y movilidad.	33
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la región río arriba del gen <i>flgC</i> . I.....	37
Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la región río arriba del gen <i>stas</i>	37
Tabla 6. Reacción enzimática con PNPG..	46
Tabla 7. Actividad enzimática de la β -Glucuronidasa.....	47

Tabla de anexos

Figura S 1. Cromatograma de secuenciación del promotor STAS.....	52
Figura S 2. Cromatograma de secuenciación del promotor FlgC.....	52

Tabla de abreviaturas

ACT - Aspartato quinasa, Corismato mutasa
ADN - Ácido desoxirribonucleico
ADP - Adenosin difosfato
Ap - Ampicilina
ARN - Ácido ribonucleico
AT - Adenina-timina
ATP - Adenosin trifosfato
bEBP - Proteínas de unión potenciadoras bacterianas}
CBB - Azul brillante de coomassie
CC - complejo cerrado
cGMP - Guanosin monofosfato cíclico
CTAB - Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
DMSO – Dimetilsulfóxido
DO - Densidad óptica
EBP - Proteínas de unión potenciadoras
EM - Microscopia electrónica
GFP - proteína verde fluorescente
Gm - Gentamicina
HCl - Ácido clorhídrico
Hk - Histidin cinasa
HTH - Hélice vuelta hélice
IAA - Acido indol-3-acetico
IHF/HU - Factor de integración del huésped
Km - Kanamicina
LB - Luria Bertani
MCP - Proteína aceptadora de metilo
mg - miligramos
mL - mililitros
NO - Óxido nítrico
NTP - Nucleótido trifosfato
OC - Complejo abierto
ORF - Marco de lectura
PAS - Per, ARNT y Sim. Dominio detector que une luz, oxígeno, sustancias redox.
pb - pares de bases
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR - Rizobacteria Promotora del Crecimiento de la Planta

pH - potencial de Hidrogeno

PNPG - p-Nitrofenil α -D-glucopiranosido

PspF - Proteína F de fagos

RC - Rojo Congo

REC - : Dominio involucrado en regulación de respuesta

RMN - Resonancia magnética nuclear

RNAP - Enzima ARN polimerasa

RR - Regulador de respuesta

Tc - Tetraciclina

Tm - Temperatura de hibridación

TRx - tiempo de reacción

UAS - Secuencias activadoras rio arriba

V4R - Vinil 4 Reductasa

WT - wild type / tipo salvaje

XylR-N: Dominio detector de azúcar

1. Resumen

El constante aumento poblacional sugiere un gran problema para la producción agrícola, la cual ha recurrido a la utilización de agroquímicos para poder solventar la demanda de productos alimenticios en el mercado, sin embargo, las consecuencias de su uso constante trae consigo la pérdida de fertilidad del suelo, afectando el abastecimiento de productos agrícolas, por lo que la aplicación de una agricultura sustentable puede ser una alternativa, a través del uso de buenas prácticas y bioinoculantes, estos últimos son capaces de influir positivamente en el crecimiento de las plantas para una mejor producción, es decir, son benéficos para las plantas. A este tipo de microorganismos se les conoce como Bacterias Promotoras del Crecimiento vegetal o PGPR por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Azospirillum* es uno de los géneros principales que conforman las PGPR's y uno de los más estudiados y comercializados.

Se ha reportado que para que los efectos benéficos de *Azospirillum*, como la fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, control de fitopatógenos y protección contra estrés abiótico, es necesario que estas bacterias colonicen la rizosfera, por lo que es un paso importante para que la interacción bacteria-planta se lleve a cabo, este proceso depende de otros procesos muy importantes, como la movilidad y la adhesión a las raíces para la formación de biopelícula, a través de la quimiotaxis, movimiento que depende del flagelo, el cual se encarga de llevar a la bacteria hacia los rizodepósitos.

Estudios recientes sobre la estructura de la proteína TyrR han proporcionado información importante de la alta homología que guarda con otras proteínas TyrR de otras bacterias, así como de la identificación de un motivo GAFTGA en el dominio central, siendo indispensable para la activación dependiente de σ^{54} . Para el correcto análisis fenotípico se requirió el uso de una mutante la cual fuera deficiente de TyrR (Mut. 2116 *tyrr minus*), y así poder hacer las comparaciones adecuadas y evaluar la participación de la proteína TyrR en la regulación de ciertos genes.

Un análisis bioinformático nos permitió observar y ubicar *in silico* las secuencias de presuntos promotores de interés en *Azospirillum brasilense* Sp7 y con base a ello suponer que pudiesen ser regulados por TyrR, además de analizar la adquisición de

esta proteína al género *Azospirillum* y más específicamente en *Azospirillum brasilense* Sp7.

El presente trabajo aborda un regulador transcripcional, TyrR, en *Azospirillum brasilense*, una de las PGPR más estudiadas, para evaluar la regulación de TyrR en selectos promotores implicados en la formación de biopelícula.

2. Introducción

El interés por generar una agricultura sustentable la cual cumpla con adecuadas prácticas de producción cuyo objetivo sea satisfacer las necesidades humanas conservando y mejorando la calidad de los productos y del ambiente, es decir, hacer un uso eficiente de los recursos no renovables y disminuir el uso de agroquímicos, ha llevado a buscar alternativas las cuales generen un alto rendimiento de producción sin dañar las condiciones del suelo y agotar sus nutrientes. Una propuesta viable es el uso de inoculantes bacterianos, los cuales pueden incrementar la productividad de ciertos cultivos sin causar degradación del suelo, estos inoculantes microbianos actúan a nivel de la rizosfera, donde se genera una interacción bacteria-planta (23, 27).

Lorenz Hiltner, en 1904 utilizó el término rizosfera para referirse a la interacción bacteria-raíz en leguminosas (16), el constante interés por conocer más sobre lo que engloba la rizosfera llevó a redefinir considerando los cambios biológicos, químicos, bioquímicos y físicos que ocurrían, resultado del crecimiento de las raíces, absorción del agua y nutrientes, la rizodeposición y la respiración, refiriéndose a cierto volumen de suelo que es adyacente a la raíz y que es afectado por ella (16, 27). Las raíces liberan exudados radiculares (ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, flavonoides, atrayentes bacterianos, vitaminas entre otros), que una vez liberados alteran las propiedades del suelo proporcionando un sustrato adecuado para el desarrollo de comunidades bacterianas (4, 20).

A las comunidades bacterianas, que afectan de manera positiva el desarrollo de las plantas se les conoce como Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés), término acuñado por Kloepper y Schroth en 1978, ya que son capaces de colonizar activamente el sistema radicular para mejorar su crecimiento y rendimiento (18,20).

La colonización de la rizosfera es un paso importante para que el beneficio de la interacción bacteria-planta se lleve a cabo, este proceso depende de otras funciones muy importantes, como la movilidad y la adhesión a las raíces para la formación de biopelícula, a través de la quimiotaxis, movimiento que depende del flagelo, el cual se encarga de llevar a la bacteria hacia los rizodepositos (19, 27), es decir, involucra la participación y regulación de genes implicados en el funcionamiento de diversos mecanismos de colonización y biosíntesis, por lo que el estudio de la regulación a nivel transcripcional es importante para la comprensión de los mismos.

3. Antecedentes

3.1 Antecedentes generales

El inicio de la transcripción en bacterias requiere del reconocimiento específico por factores σ de secuencias dentro del promotor en el ADN. Además de un mecanismo para la desnaturalización del ADN en el sitio promotor para liberar la cadena codificante e iniciar la síntesis de ARN, los factores σ dirigen la unión de la polimerasa a promotores específicos y también median el evento de fusión del dúplex del ADN. El factor σ^{54} contiene un solo miembro el cual muestra poca similitud con σ^{70} , cuya familia está conformada por un grupo diverso de factores de mantenimiento y factores σ alternativos. La iniciación de la transcripción por σ^{54} requiere de activadores para la isomerización del complejo cerrado, estos activadores se unen a los sitios -80 a -150 pb río arriba del promotor, también conocidos como secuencias activadoras cadena arriba (UAS) o sitios potenciadores (10, 11).

Características del factor σ^{54} y el factor σ^{70}

El factor σ^{54} varía de la clase σ^{70} debido a que cada miembro del factor σ^{70} se une a los elementos promotores conservados -10 y -35 aunque la secuencia consenso y espaciado sean diferentes para cada factor de esta clase. La unión de σ^{54} se produce en los elementos GG -24 y GC -12 que forman parte de una secuencia consenso más amplia. El elemento -12 es importante para la transcripción, ya que cambios en este elemento o sustitución de aminoácidos en σ^{54} deterioran la transcripción, además, eliminaciones de nucleótidos entre los elementos -12 y -24 restringen la función del promotor, por lo que el espacio entre ambos elementos es

fundamental para la transcripción mediada por σ^{54} . A pesar de que los miembros de las dos familias se asocian a la misma enzima ARN polimerasa central (RNAP), las holoenzimas resultantes actúan a través de mecanismos completamente diferentes para activar la transcripción, el factor σ^{70} unido a las secuencias consenso -10 y -35 forma un complejo cerrado (CC) energéticamente desfavorable que facilita el paso a un complejo abierto (OC), en contraste el factor σ^{54} requiere de activadores específicos de la clase AAA+, llamados bEBP, que acoplen la energía a partir de la hidrólisis del ATP para la isomerización del complejo cerrado RNAP- σ^{54} y de paso a la iniciación de la transcripción, esto se debe a que la interacción entre σ^{54} y los elementos -12/-11 forman una fusión temprana similar a una unión en horquilla, ya que se une estrechamente a secuencias promotoras y no a la hebra complementaria evitando la isomerización espontánea. Sin embargo, el paso dependiente de la energía por hidrólisis del ATP asegura la eliminación de la interacción inhibitoria en la posición -12/-11 para que se dé la formación de complejos abiertos en el sistema σ^{54} (2, 19).

El factor σ^{54} posee 3 regiones basadas principalmente en la función más que en su estructura. La región I (Residuos 1 a 56 en *E. coli*) es una secuencia rica en glutamina y leucina, representa el dominio regulador de σ^{54} que se une al elemento promotor -12 para formar el centro regulador RNAP- σ^{54} , la cual evita la isomerización espontánea del complejo cerrado y además esta región es el objetivo del activador AAA+ en la transcripción dependiente de σ^{54} . La región II es variable en composición y longitud de aminoácidos, conformándose desde 26 hasta 110 residuos dependiendo del género bacteriano, pero se puede caracterizar por el predominio de ciertos residuos de aminoácidos ácidos, esta región no es esencial para la transcripción, sin embargo, se ha demostrado que la eliminación de ésta en unas bacterias altera la actividad de la holoenzima en la isomerización a complejos abiertos. Evidencia reciente sugiere que esta región está implicada en la unión y la fusión del ADN. La región III C-terminal (108 a 477 residuos en *E. coli*) está bien conservada y contiene los principales determinantes de la unión al ADN promotor (329 residuos a 463 en *E. coli*), incluyendo un motivo de entrecruzamiento del ADN (329 a 346 residuos en *E. coli*) y una caja RpoN (454 a 463 residuos en *E. coli*). Estudios estructurales basados en resonancia magnética nuclear (RMN) de la región III de σ^{54} en *Aquifex aeolicus*

reveló la presencia de un motivo HTH en el que la caja RpoN forma la hélice de reconocimiento que se une al elemento promotor -24. Antes de la caja RpoN se encuentra un motivo HTH adicional que se une al elemento promotor -12. Esta región de σ^{54} contiene además determinantes para la unión de RNAP central (120 a 215 residuos) (Figura 1) (2, 10).

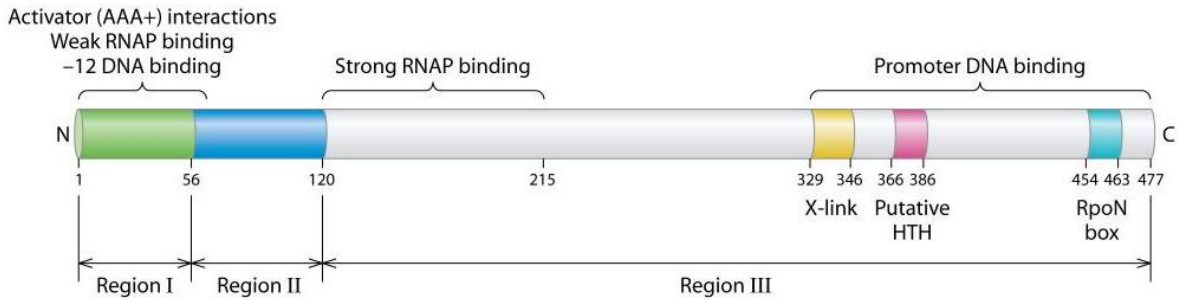


Figura 1. Organización del dominio de Sigma 54. Residuos 1 a 477, posee 3 regiones (I, II y III). La región I interactúa con el activador de la transcripción. La Región II suele ser ácida y por lo general ausente. La región III, incluye a la región de entrecruzamiento del ADN, el motivo HTH y la caja RpoN, presentes en el extremo C terminal. Recuperado de Bush and Ray. "The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ^{54} -Dependent Transcription." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012.

Proteínas de Unión Potenciadoras (EBP)

Por las similitudes que existe entre la unión a proteínas de unión potenciadoras eucariotas (EBP), los activadores dependientes de σ^{54} se denominan proteínas potenciadoras de unión al ADN bacterianas (bEBP) y debido a la similitud en estructura y función son clasificadas como miembros de las proteínas AAA+ (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares). Estas proteínas son universales en los organismos vivos y se encargan de convertir la energía química almacenada como ATP a energía mecánica para procesos celulares. Dado que las bEBP se unen río arriba del sitio de inicio de la transcripción, para que el activador pueda interactuar con la holoenzima RNAP- σ^{54} es necesario que el ADN sufra un doblamiento entre los potenciadores y el sitio promotor. Dicho bucle de ADN observado a través de microscopía electrónica (EM) y microscopía de fuerza atómica de barrido ha demostrado que a menudo es ayudado por el factor de integración del huésped (IHF) y/o HU, proteínas pequeñas heterodiméricas que se unen entre los sitios del promotor y del potenciador y que son capaces de doblar a la doble hélice 180 grados. Además de lograr un contacto eficaz entre el activador y la holoenzima, IHF en la topología del ADN contribuye a la especificidad y eficiencia de la activación (2, 26, 13).

Los bEBP son proteínas moduladoras especializadas de la transcripción σ^{54} -dependiente, constan de tres dominios, un dominio regulador (R) N-terminal involucrado en la percepción de la señal y modula la actividad de la bEBP, un dominio AAA+ central (C) responsable de la hidrólisis de ATP para activar la transcripción dependiente de σ^{54} y el dominio de unión al ADN C-terminal (D) que contiene el motivo HTH que permite el reconocimiento específico del sitio UAS. Debido a que los dominios reguladores no comparten una homología en común y a que tienen varios motivos sensoriales la familia bEBP se ha dividido en cinco grupos (Figura 2) (2,10).

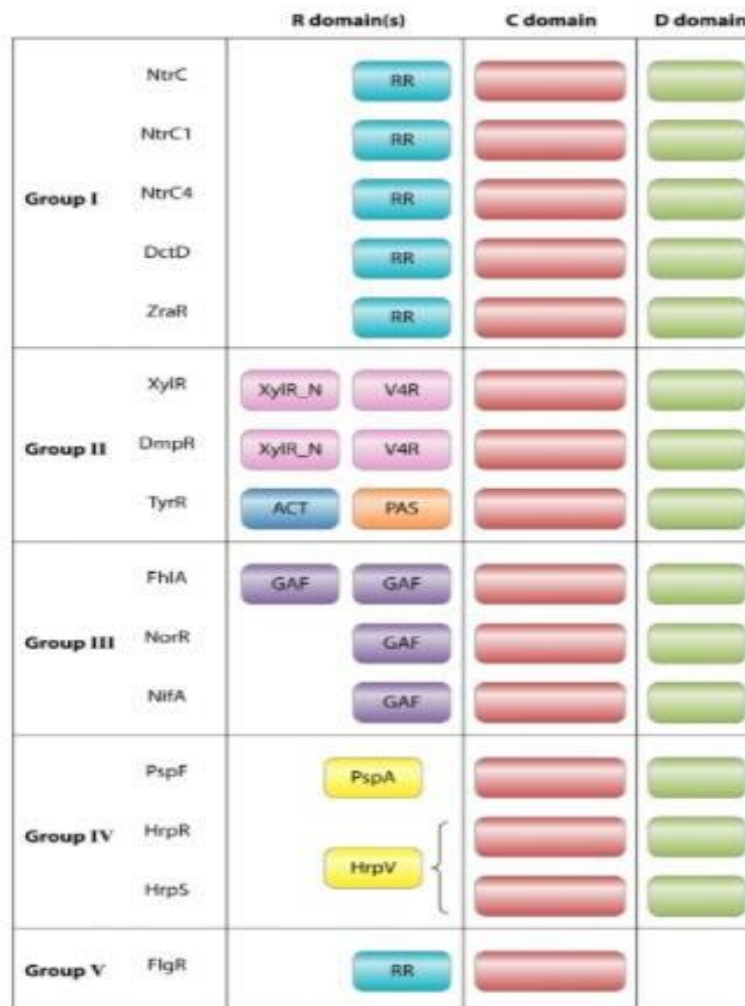


Figura 2. Arquitectura de dominio de los cinco grupos clásicos (grupos I a V) de bEBP. Tomada de “The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of 54-Dependent Transcription” (p.2). Bush & Dixon, 2012, Microbiology and Molecular Biology Review 76.

Dominio central

El dominio central AAA+ está implicado en la unión e hidrólisis de nucleótidos, la oligomerización y el contacto con σ^{54} . Siendo el dominio más conservado, se ha dividido en siete regiones conservadas, C1 a C7. Las bEBP contienen dos inserciones únicas que forman bucles de superficie expuesta, el bucle 1 (L1) que se forma a partir de una inserción que se proyecta fuera de una hélice α en la región C3 y contiene un motivo GAFTGA altamente conservado, mientras que L2 se encuentra insertado entre C5 y C6, ambos tienen un papel importante en interacciones con σ^{54} (2, 13).

Los dominios AAA+ se caracterizan por poseer los motivos Walker A (WA) ubicado en la región C1 formando un bucle P con la secuencia consenso GxxxxGK (T/S) que interactúa con los fosfatos del ATP y Walker B (WB), en la región C4, que tiene una secuencia consenso hhhhDE (h es cualquier aminoácido hidrófobo), este motivo es necesario para la hidrólisis de nucleótidos. Otra característica común de estas proteínas AAA+ es la presencia de los motivos del sensor I y sensor II, presentes en las regiones conservadas C6 y C7, los residuos del sensor I se encuentran dentro de un bucle que contiene un residuo de treonina conservado que interactúa con el segundo residuo ácido del motivo Walker B y que está implicado en el acoplamiento e hidrólisis de nucleótidos a cambios conformacionales en L1 y L2 expuestos a la superficie. Los residuos del sensor II en C7 se encuentran en la tercera hélice del subdominio de hélice y están implicados en la unión de nucleótidos. Los miembros de la superfamilia AAA+ también contienen uno o dos residuos de arginina (dedos R) implicados en la catálisis entre subunidades y detección de nucleótidos (2).

El motivo GAFTGA (en la región 3), es una característica estructural de la subfamilia de dominios AAA+ de las bEBP, este motivo altamente conservado forma un bucle en la superficie del dominio AAA+ que contacta con σ^{54} durante la hidrólisis de ATP. Por lo que se ha demostrado que el motivo GAFTGA es crítico para la formación de complejos abiertos y una mutación en cualquiera de los seis aminoácidos tiene graves repercusiones sobre la capacidad para hidrolizar ATP, ponerse en contacto

con σ^{54} o activar la transcripción. Por lo que se ha sugerido que una comunicación de esta información a σ^{54} a través de la región I podría permitir que σ^{54} establezca contacto con el ADN monocatenario, que es necesario para la formación de complejos abiertos (26).

La mayoría de las bEBP existen equilibradamente entre formas diméricas y hexaméricas, en el caso de PspF (proteína F de fagos, en *E. coli*), la unión de ATP o ADP promueve la hexomerización e hidrólisis de ATP (2, 13).

La hidrólisis del ATP acoplada a la formación del complejo abierto a través de cambios conformacionales en el dominio AAA+ conduce a la reubicación de L1 y L2 que contienen a GAFTGA. Debido a que el sitio de hidrólisis se forma entre interacciones de residuos de protómeros adyacentes, es necesario la oligomerización del dominio AAA+ para formar una bEBP capaz de activar la transcripción, en respuesta a una señal estimulante de la oligomerización de la bEBP se facilita por medio de interacciones entre los dominios centrales AAA+(C). El estado oligomérico funcional exacto de las bEBP varía según el organismo o el grupo evolutivo, formando hexámeros o heptámeros (2)

Dominio R

Muchas bEBP contienen el dominio N-terminal o regulador (R), que responde a diversas señales ambientales, capaz de regular la actividad del dominio AAA+ central, quienes carecen del dominio R solo constan de los dominios C y D o del dominio de unión al ADN (dominio R más C). Hay tres formas principales en las que el dominio regulador logra la regulación de bEBP en respuesta a una señal ambiental, las cuales son la fosforilación, la unión a ligando y las interacciones proteína-proteína, así como también está la clasificación según el tipo de dominio presente en el extremo amino terminal de la proteína, dependiendo del método de activación de bEBP, por lo que se hayan clasificadas en cinco grupos (I al V).

Las bEBP del grupo I contienen un dominio regulador de respuesta (RR), el grupo II contiene dominios Per, ARNT y Sim (PAS) o dominio XylR-N y V4R (vinil reductasa), las bEBP del grupo III contienen una fosfodiesterasa estimulada y específica de cGMP, una adenilato ciclasa de *Anabaena* y el dominio FhIA (GAF)

de *E. coli*. HrpR y HrpS del grupo IV son coactivadores de la transcripción (2).

Fosforilación: varias bEBP son parte de sistemas de dos componentes (TCS, por sus siglas en inglés) que acoplan un estímulo externo a una respuesta interna, estos sistemas se componen por una cinasa de histidina (HK) con un dominio central de cinasa conservado y una proteína reguladora de respuesta (RR) con un dominio regulador conservado. La HK detecta los estímulos para modular su actividad en la fosfotransferencia, ya que transfiere un grupo fosforilo a un aspartato conservado en el RR, una vez que el RR es fosforilado es capaz de activar un dominio efector río abajo que provoca una respuesta específica en la célula bacteriana, en los casos de respuesta al estado de nitrógeno en la célula la cascada de fosforilación se encuentra controlada por la uridililtransferasa (GlnD), (2).

Unión a ligando: Algunos activadores tienen un dominio regulador (R) que se une a pequeñas moléculas efectoras (Figura 2), la unión de ligando directa de compuestos aromáticos a un dominio de vinil 4 reductasa (V4R) activa a DmpR (*Pseudomonas* sp) y XYLR (*Pseudomonas putida*), bEBP del grupo II, y como respuesta a la unión de ligando pequeños DmpR codifican las enzimas involucradas en el catabolismo de fenol y metilfenoles. Entre otras respuestas que puede tener la unión a ligando por diferentes proteínas son la activación de la transcripción del sistema de formiato hidrogeno-liasa, desintoxicación del óxido nítrico (NO) o la detección de señales a través de un cofactor. La proteína tipo bEBP TyrR de *E. coli* contiene tanto el dominio PAS como el dominio ACT, además facilita la activación o represión de la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis y el transporte de aminoácidos aromáticos, aunque no es un activador de la transcripción dependiente de σ_{54} . Por lo cual se piensa que el dominio ACT es el sitio de unión para tirosina, fenilalanina o triptófano, mientras que PAS tiene un papel de contacto con el α CTD de RNAP.

Las **interacciones proteína-proteína** forman parte de otro grupo de bEBP quienes por este medio regulan la actividad del dominio AAA+, estas interacciones se efectúan con otra proteína llamada anti activador (2,10).

Las bEBP han desarrollado diferentes métodos para la transducción de señales del dominio R (sitio de detección) al dominio C catalítico, la transducción puede estar sujeta a un control positivo o un control negativo, siendo este último el mecanismo de control dominante. Dado que es indispensable el control de la actividad del dominio AAA+ por la regulación de bEBP ante respuesta de señales ambientales, el dominio R se dirige a tres aspectos diferentes de la actividad AAA+; la oligomerización del dominio AAA+, la actividad ATPasa de este dominio y la interacción con σ^{54} (Figura 3), (2).

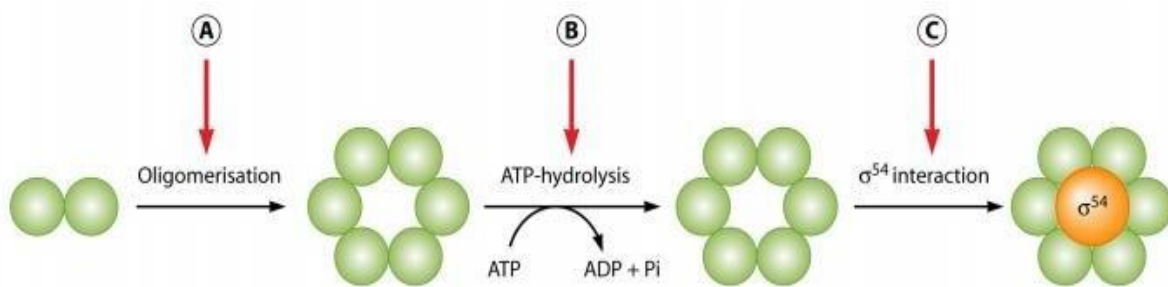


Figura 3. Posibles objetivos de la regulación mediada por dominios regulados. A. Comúnmente el dominio regulador reprime la oligomerización (NtrC1 y DctD) o promueve la autoasociación en respuesta a una señal (NtrC). B. La regulación negativa se dirige a la hidrólisis de nucleótidos (PspF), la unión a ATP establece una interacción débil con σ^{54} mientras que la hidrólisis de ATP establece una interacción fuerte, remodelado la holoenzima. C. Podría representar un mecanismo de control, donde la interacción de NorR con σ^{54} podría ser el objetivo regulatorio. Tomada de “The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of 54-Dependent Transcription” (p.2). Bush & Dixon, 2012, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76 (3).

Papel del dominio C-terminal (D)

También denominado, de unión al ADN (D), dirige la unión de la bEBP a través del motivo HTH a los sitios potenciadores típicamente de -80 a -150 pb río arriba del promotor. Tiene la función de dirigir la unión del activador a los objetivos de ADN, asegurando una respuesta específica, también es responsable de facilitar la formación de oligómeros y que se ha demostrado que la oligomerización depende del ADN en las bEBP XylR, NtrC y NorR, cuando está presente más de un sitio UAS, la unión de múltiples dímeros de bEBP al ADN potenciador conduce a un aumento en la concentración local del activador facilitando así la oligomerización, así como estabilizar el hexámero y mantener la fidelidad regulatoria del dominio R

(2, 13).

La especificidad de la interacción del ADN se mantiene mediante sitios de unión bien conservados del potenciador (UAS), que son mediadas a través del reconocimiento de la segunda hélice del motivo HTH. La mayoría de la bEBP se une al ADN como dímeros al menos en un sitio de reconocimiento o cajas, además se han identificado hasta tres cajas río arriba del promotor blanco (2, 13).

3.2 Antecedentes específicos

Genero *Azospirillum*

El género *Azospirillum* spp., se encuentra conformado por bacterias gram negativas vibroides, no forman esporas y además poseen gránulos de polihidroxibutirato y que pueden formar quistes. Estas bacterias pertenecen al filo alfa-proteobacteria, y constituye una subclase de la familia *Rhodospirillaceae*, originalmente descrito por Krieg y Döbereiner, para incluir a una especie anteriormente llamada *Spirillum lipoferum*. Tienen un flagelo polar y varios flagelos laterales cortos. Son microorganismos quimioorganotrofos aeróbicos no fermentativos presentes en una gran diversidad de ambientes y plantas, incluyendo aquellos de importancia agronómica (caña de azúcar, cereales, gramíneas forrajeras) además de otras especies vegetales como café, frutales y plantas florales (1, 28).

Las bacterias de este género son Promotoras del Crecimiento Vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB por sus siglas en inglés) mejores estudiadas en agricultura por ser capaz de fijar N_2 , el metabolismo del N_2 le permite adaptarse a diferentes condiciones del suelo y, por lo tanto es un microorganismo competente para colonizar la rizosfera, concepto introducido en 1904 por Lorenz Hiltner para referirse a la interacción entre rizobacterias y raíces de plantas leguminosas, y/o tejidos internos de la planta (4, 11, 23). Generalmente la rizosfera está compuesta de minerales, agua y oxígeno además de materia orgánica, debido a las sustancias inorgánicas presentes y a las sustancias orgánicas que las plantas exudan a través de sus pelos radicales, también llamadas rizodeposiciones, resultados de procesos fotosintéticos, *A. brasilense* y *A. lipoferum* son los mejores caracterizados tanto

bioquímica como genéticamente para la adaptación al medio, además de su uso en inoculantes comerciales por su capacidad de colonizar más de 100 especies vegetales (11, 23, 25).

Azospirillum tiene múltiples mecanismos adicionales que contribuyen a un mayor crecimiento y rendimiento de cultivos como la solubilización de fosfato, producción de hormonas, sideróforos, control de fitopatógenos y protección contra estrés abiótico como salinidad, sequía o compuestos tóxicos. Además, es capaz de promover el crecimiento indirectamente mediante mecanismos que ocurren al exterior de la planta, o bien mediante mecanismos directos que ocurren en el interior de la misma y afectan directamente su metabolismo (1, 23, 28).

La unión a las raíces superficiales, a través de movimientos quimiotácticos, es considerada el primer paso necesario para la colonización de la planta, estableciendo asociaciones simbióticas en los pelos radiculares, algunas cepas son capaces de colonizar tejidos internos como bacterias endofíticas sin mostrar efectos negativos en el hospedero (3, 7). La formación de biopelícula, la cual es un proceso complejo que sucede en diferentes fases, iniciando con la adhesión, fijación, maduración y dispersión, les permite a las bacterias incrementar su capacidad de adherencia, colonización y tolerancia al estrés ambiental, así como proveerles un nicho protector para posteriormente colonizar otras raíces (4, 16, 19).

Se ha demostrado que *Azospirillum* spp ejerce un efecto positivo en el número de nódulos inducidos por *Rhizobium*, desarrollo de la planta, peso seco y fijación de N₂, por lo cual es el principal inoculante comercial para cultivos de cereales. Además, induce el crecimiento de pigmentos fotoprotectores como carotenoides necesarios para la fotosíntesis o contrarrestar las moléculas oxidativas producidas durante la salinidad, sequía o situaciones de estrés como frío (23).

Factor de Transcripción TyrR de *A. brasilense*

El factor transcripcional TyrR ha mostrado desempeñar un papel muy importante en la regulación de genes que son esenciales para la biosíntesis, el transporte y la degradación de aminoácidos. A través de una búsqueda bioinformática de BLASTP,

utilizando una secuencia de aminoácidos de TyrR de *E. coli* K12, se localizó el gen *tyrR* en el genoma de *A. brasilense*, del cual se identificó una proteína que es codificada por el gen AMK58_RS07030 mostrando un 43% de identidad y un 59% de similitud con respecto a TyrR de *E. coli*. El gen *tyrR* fue amplificado por PCR de ADN cromosomal de *A. brasilense* Sp7 (12).

El gen encontrado y amplificado fue clonado y secuenciado y la proteína traducida se analizó mediante alineación de secuencia múltiple con proteínas TyrR. La proteína TyrR se analizó mediante estudios estructurales utilizando el N-terminal del modelo de proteína TyrR de *E. coli* K12, el dominio de ATPasa AAA+ central de Pa_FleQ-A+ de la proteína modelo de *P. aeruginosa* y el dominio de unión del ADN al ADN C-terminal del modelo de proteína TyrR de *H. influenzae*. La proteína compartía una gran similitud con cada dominio con respecto a la organización del dominio, motivos característicos, estructura secundaria y características topográficas que exhiben las proteínas de unión a potenciadores bacterianos (bEBP) (12).

El análisis bioinformático del genoma completo de *A. brasilense* Sp7 permitió identificar motivos con fuerte homología a los descritos como sitios de unión para TyrR que incluían la secuencia consenso (TGTAACG-N4-CTTTACA), proporcionando información de supuestas cajas TyrR en la región promotora de genes posiblemente regulados por TyrR, además se sabe que varios regulones (metabolismo de aminoácidos, metabolismo de ácidos grasos, glucosiltransferasa, actividad de transducción de señales, actividad de transporte de membrana y regulación transcripcional), así como genes de función desconocida tienen secuencias promotoras que contienen motivos que coinciden con una o más cajas TyrR. La región promotora intergénica posee tres cajas TyrR y río abajo del gen *tyr* se encuentra el gen AMK58_RS07035, que codifica un D-aminoácido deshidrogenasa involucrada en el catabolismo de D-alanina, importante para utilizar a la D-alanina como única fuente de carbono (12).

El regulador transcripcional TyrR de *A. brasilense* Sp7 no participa directamente en la regulación de la biosíntesis de IAA, sin embargo, regula la transcripción del gen *dadA* que codifica D-alanina deshidrogenasa, que rompe el enlace entre el grupo

amino y la estructura carbonada lo que permite el uso de la D-alanina como única fuente de carbono. Además, el regulador transcripcional TyrR está involucrado en la regulación de la formación de biopelículas en *A. brasilense* Sp7, hipotetizando que se debe por la regulación de genes que codifican proteínas específicas como la glucosiltransferasa, responsable de la transferencia de azúcares de nucleótido difosfato a sustratos como polisacáridos, proteínas transductores de señales como la proteína de quimiotaxis aceptora de metilo (MCP), (10, 12).

Debido a las características exhibidas por la proteína TyrR de *A. brasilense* Sp7 se ha clasificado como una proteína de unión potenciadora bacteriana (bEBP), siendo un activador dependiente de σ^{54} , lo que podría clasificarse como miembro de la subfamilia del grupo II de proteínas AAA+. Debido a sus características, el factor transcripcional TyrR de *A. brasilense* ha demostrado tener un papel importante en la regulación de genes esenciales para biosíntesis, transporte y degradación de aminoácidos (12).

4. Justificación

Con la intención de dirigir a la agricultura mundial hacia un enfoque más sustentable y amigable con el medio ambiente y que así mismo satisfaga la demanda de alimentos de la población, generando productos de calidad nutritiva, los microorganismos del suelo resultan de gran interés como alternativa biológica y ambientalmente favorable para la recuperación de suelos agrícolas debido al uso intensivo de los agroquímicos. Estos microorganismos tienen un papel fundamental e importante en la regulación de una rizosfera fértil, permitiendo la conservación de la diversidad vegetal en los ecosistemas. *Azospirillum brasilense*, es considerada una rizobacteria PGPR debido a la capacidad de promover el crecimiento vegetal de cultivos de interés agronómico actuando principalmente a nivel de las raíces.

En este trabajo se pretende estudiar si presuntos promotores, que le confieren la característica de PGPR a *A. brasilense* Sp7, se encuentran regulados por la proteína potenciadora TyrR, ya que el pronto estudio y entendimiento de los mecanismos directos e indirectos por los cuales *A. brasilense* logra interactuar con la planta y promover beneficiosamente un mejor desarrollo a través de la colonización, fijación de nitrógeno y disponibilidad de nutrientes, entre otros, permitirá un mejor

aprovechamiento y optimización de estos efectos benéficos en una agricultura sustentable.

5. Planteamiento del problema

Conocer los mecanismos por los cuales *A. brasilense* logra la correcta interacción con la planta, es decir, la quimiotaxis y la colonización, que son procesos fundamentales para los efectos beneficiosos, permitirá aprovechar el uso adecuado de las bacterias.

Determinar si el factor transcripcional TyrR de *A. brasilense* está involucrado en la regulación de presuntos promotores implicados en la formación de biopelícula y quimiotaxis, a través de la generación de una mutante TyrR, nos permitirá conocer más a detalle su función en los genes de interés, es por ello que un primer análisis *in silico*, como la bioinformática, nos puede proporcionar un panorama general de lo que está ocurriendo con los genes de interés, estos resultados darán paso a los estudios y análisis experimentales para una mejor comprensión de estos procesos.

6. Hipótesis Científica

La proteína TyrR de *A. brasilense* Sp7 está involucrada en la regulación de la expresión de genes que participan en la actividad de transducción de señales, y que se presupone pueden estar relacionados en mecanismos de quimiotaxis y formación de biopelícula.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Determinar la actividad de presuntos promotores regulados por TyrR en *A. brasilense* Sp7.

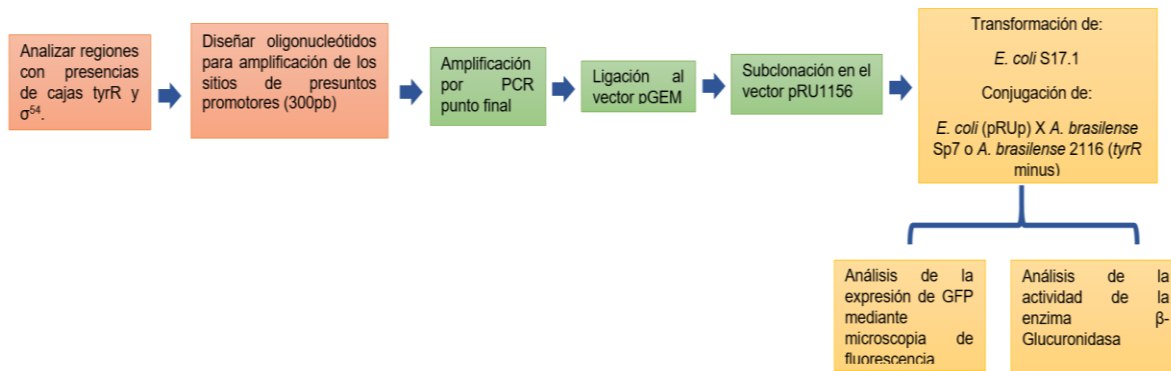
7.2 Objetivos Particulares

Analizar de manera bioinformática las secuencias de presuntos promotores regulados por TyrR.

Construir fusiones transcripcionales *pRUPr-tyrR-gfp-gusA*.

Expresar las fusiones transcripcionales en *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus).

8. Esquema de trabajo



9. Materiales y métodos

9.1 Material biológico

Tabla 1. Cepas, plásmidos y reactivos empleados en este estudio.

Cepas empleados en este estudio		
Cepa	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> HB101	Contiene el plásmido “helper” pRK2013	Bioresearch Technologies
<i>Escherichia coli</i> DH5α	$\Delta(argF-lac)169$, $\phi80dlacZ58(M15)$, $\Delta phoA8$, $glnX44(AS)$, $deoR481$, $rbcC1$, $gyrA96(NalR)$, $recA1$, $endA1$, $thiE1$ and $hsdR17$.	TermoFisher Scientific
<i>Escherichia coli</i> DH5α pRU11pflgC	Derivada de <i>Escherichia coli</i> DH5α, con el plásmido pRU11pflgC. Tc ^R	Este estudio
<i>Escherichia coli</i> DH5α pRU11pSTAS	Derivada de <i>Escherichia coli</i> DH5α, con el plásmido pRU11pSTAS. Tc ^R	Este estudio
<i>Escherichia coli</i> DH5α pGEMpflgC	Derivada de <i>Escherichia coli</i> DH5α, con el plásmido pGEMpflgC. Ap ^R	Este estudio
<i>Escherichia coli</i> DH5α pGEMpSTAS	Derivada de <i>Escherichia coli</i> DH5α, con el plásmido pGEMpSTAS. Ap ^R	Este estudio
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre	Tarrand et al, 1978
<i>A. brasilense</i> 2116	Derivada de <i>A. brasilense</i> Sp7 mutada en el gen <i>tyrR</i> . Gm ^R	Jijón Moreno et al. 2019

<i>A. brasilense</i> pRU11pflgC	Derivada de <i>A. brasilense</i> Sp7, con el plásmido pRU _{pflgC} . Tc ^R	Este estudio
<i>A. brasilense</i> pRU11pSTAS	Derivada de <i>A. brasilense</i> Sp7, con el plásmido pRU _{pSTAS} . Tc ^R	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 2116 pRU11pflgC	Derivada de <i>A. brasilense</i> 2116, con el plásmido pRU _{pflgC} . Tc ^R / Gm ^R	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 2116 pRU11pSTAS	Derivada de <i>A. brasilense</i> 2116, con el plásmido pRU _{pSTAS} . Tc ^R / Gm ^R	Este estudio
<i>A. brasilense</i> 2116 pRU11pmpc	Derivada de <i>A. brasilense</i> 2116, con el plásmido pRU _{pMCP} . Tc ^R / Gm ^R	Este estudio
Plásmidos empleados en este trabajo		
pGEM T-Easy	Vector de clonación	Promega
pRU1156	Contiene las secuencias que codifican los genes reporteros <i>gfp</i> y <i>gusA</i> . Ap ^R , Tc ^R	Karunakaran <i>et al.</i> 2005
pRU1156pflgC	Derivada del plásmido pRU1156 con la región promotora del gen <i>FlgC</i> , codificante de una proteína estructural del flagelo.	Este trabajo
pRU1156pflgC	Derivada del plásmido pRU1156 con la región promotora del gen que codifica para un factor anti-sigma	Este trabajo
Reactivos Biológicos		
Ligasa T4	Enzima para los ensayos de clonación	Promega
<i>Hind</i> III (10 U/μL)	Enzima de restricción para Oligonucleótido delantero	TermoFisher Scientific
<i>Sna</i> BI (10 U/μL)	Enzima de restricción para oligonucleótido reverso	TermoFisher Scientific
<i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity	Amplificación de fragmentos con fidelidad y hasta 15kb.	TermoFisher Scientific

9.2 Técnicas y procedimientos

9.2.1 Análisis bioinformático

Se partió de un análisis de regiones promotoras en el genoma de *A. brasilense* Sp7, reportadas por Jijón Moreno *et al* (2019), se consideraron para este estudio las regiones promotoras que contenían una caja de unión a TyrR, sitios de unión a σ^{54} y que presuntamente estaban involucradas en traducción de señales y/o en procesos de quimiotaxis o movilidad, para lo cual se utilizó las herramientas bioinformáticas FIMO (Find Individual Motif Occurrences) y Softberry, se usó el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) para explorar los dominios proteicos de los genes seleccionados.

Para realizar el diseño de oligonucleótidos se emplearon las herramientas SnapGene y Oligoanalyzer®, se tomaron en cuenta los criterios para el diseño de los cuales se enlistan a continuación:

- La longitud de los iniciadores debe tener una longitud entre 18-24 pb.
- El contenido de G:C en cada iniciador debe ser de 40%-60%
- La temperatura de hibridación (T_m) debe ser entre 52°C y 62°C
- La diferencia de T_m entre ambos iniciadores no debe superar los 5°C
- No se deben formar secuencias auto-complementarias ni formar horquillas
- La energía libre de Gibbs (ΔG) de las horquillas debe ser menos a -10 kcal/mol.
- Deben ser específicos para la región que se pretende amplificar

Se añadieron secuencias reconocidas por enzimas de restricción para cada oligonucleótido de cada promotor; *HindIII* (Forward) y *SpeI* (Reverse). Se diseñó un par de oligonucleótidos con el propósito de rectificar la presencia del fragmento promotor clonado en el plásmido pRU1156, los cuales amplifican río arriba del promotor y río abajo en unas secuencias del gen reportero *gfp*, que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la realización del proyecto

Oligonucleótidos empleados en este trabajo		
PrTyrR-F-Sp7	CACCATGCGCATCGACGTCCT	Jijón Moreno et al. 2019
PrTyrR-R-Sp7	GGTCCCGTCCGGAATCCCATAC	Jijón Moreno et al. 2019
PFlgC10080F	CGAAGCTTCCAGCGCAATCCCTACGAGA	Este trabajo
PFlgC10080R	GTACTAGTTAGAGATCCATGTTCCGCCT C	Este trabajo
PSTA02415F	CTAAGCTTAAGCGCATCGTCGAGCATCT	Este trabajo
PSTA02415R	CGACTAGTAAGTCACCGCCCGTCTCCTT	Este trabajo
VFF	GCAGGCGATTACATACATACATC	Este trabajo
VFR	GGTATCACCTTCAAACCTTGACTTC	Este trabajo

9.2.3 Condiciones de cultivo

Las cepas *A. brasilense* sp7, *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus) y las fusiones *A. brasilense* pRU11*pflgC*, *A. brasilense* pRU11*pSTAS*, *A. brasilense* 2116 pRU11*pflgC*, *A. brasilense* 2116 pRU11*pSTAS*, *A. brasilense* 2116 pRU11*pmpc* se sembraron en

medio selectivo gelificado Rojo Congo y medio mínimo K-lactato, se incubaron a 30°C. Las cepas *E. coli* DH5 α con las construcciones pRU11pflgC, pRU11pSTAS, pGEMpflgC y pGEMpSTAS se crecieron en medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 18h en agitación constante. Las cepas se sembraron con su respectivo antibiótico: Tc a 3 μ g/ml, Gm a 2 μ g/ml, y Ap a 10 μ g/ml.

9.2.4 Extracción y manipulación de DNA

Se realizó extracción y purificación de DNA genómico de las cepas *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 por el método de bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) de acuerdo a lo reportado por Sambrook (2001). La extracción de DNA plasmídico de pRU1156, en las construcciones de *A. brasilense*, se realizó mediante el protocolo indicado para el Kit QIAGEN Plasmid Midi 100. Para la extracción y purificación de DNA del plásmido pRU1156 en *E. coli* DH5 α se siguió el protocolo para el Kit QIAGEN Plasmid Midi el cual se adaptó para un volumen de 60 ml de medio.

9.2.5 Protocolo de PCR para amplificación de secuencias promotoras pFlgC y pSTAS

La reacción de PCR para la comprobación de la presencia de los promotores en el plásmido pRU1156, se realizó mediante la mezcla de: H₂O para PCR 1.9 μ l, DMSO 0.5 μ l, Dream Taq Polimerasa 5 μ l, oligonucleótido delantero 0.3 μ l, oligonucleótido reverso 0.3 μ l y DNA 2 μ l. El protocolo empleado fue: desnaturalización inicial 95°C/5 min, desnaturalización 95°C/30 seg, alineamiento 59°C/30 seg*30 ciclos, extensión inicial 72°C/1 min*30 ciclos, extensión final 72°C/5 min y 4°C por tiempo indefinido. Se comprobaron las construcciones de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS por patrón de restricción.

9.2.6 Condiciones de cultivo y análisis para ensayos de fluorescencia

Se evaluó el crecimiento de las fusiones *A. brasilense* pRU11pflgC, *A. brasilense* pRU11pSTAS, *A. brasilense* 2116 pRU11pflgC, *A. brasilense* 2116 pRU11pSTAS a una DO₆₀₀ después de 42 horas de crecimiento en medio K-lactato con su respectivo antibiótico, en incubación a 30°C y en agitación constante. Posteriormente se tomaron 200 μ l de cada cultivo y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min para después resuspender la pastilla en 20 μ l de agua estéril y observar en el microscopio de fluorescencia.

9.2.7 Ensayo de β -Glucuronidasa

Las construcciones de *A. brasilense* Sp7 *A. brasilense* 2116, se sembraron en medio K-lactato con el antibiótico correspondiente, se crecieron durante 18 h en agitación constante, se evaluó el crecimiento de las cepas y se estandarizó a una DO_{600} de 0.1, se bajaron 4 ml de medio de cada construcción, 1 ml en cada tubo eppendorf a 10,000 rpm/5 min para obtener el pellet, ésta se resuspendió en 1ml de $MgSO_4$ 10 mM, se tomó 100 μ l del medio y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregó 630 μ l de buffer z, esto se repitió 1 vez más, para el blanco se tomaron 730 μ l de buffer z (2 blancos, uno para cada reacción), a cada tubo eppendorf se agregó 100 μ l de la solución de PNPG y el tiempo de la reacción fue de 30 min para cada tubo eppendorf y para cada construcción, posteriormente se leyó la observancia a 405 nm dos veces para cada tubo eppendorf. El experimento se repitió con el pellet 2, 3 y 4 de cada construcción.

Para la cuantificación de mg de proteína/ml de muestra, se centrifugó a 10,000 rpm/5 minutos, 1 ml de muestra de cada construcción, el pellet se lavó con 300 μ l de PBS, posteriormente se agregó 1ml de PBS y se resuspendió el pellet, se sonicó la muestra. Se hizo una dilución 1:20 en nuevos tubos eppendorf, por lo que se agregó en cada tubo 475 μ l de PBS, a continuación se tomó 25 μ l de muestra sonicada y se añadieron al tubo eppendorf con PBS, se homogeneizo adecuadamente, se tomaron 200 μ l de muestra y se agregaron en una placa de 96 pozos se añadieron 50 μ l de CBB/HCl 2N, se realizaron lecturas dobles de cada muestra, se dejó la reacción por 10 min y se midió la DO a 610 nm, la muestra blanco se realizó con 200 μ l de PBS y 50 μ l de CBB/HCl 2N. Se repitió el mismo procedimiento para el experimento 2, 3 y 4.

Los valores se capturaron en una nueva tabla, se obtuvo el promedio de ambas mediciones de DO a 610 nm y se les resto el blanco para obtener los μ l de proteína en el factor de dilución 1:20, y se determinó la concentración de mg/ml.

10. Resultados

10.1 Análisis bioinformático de la filogenia del gen *TyrR* de *A. brasilense*.

Se realizó un análisis de la secuencia de amino ácidos (aa) del gen que codifica para la proteína TyrR de *A. brasilense*, por lo que en primera instancia se realizó una comparación de la secuencia de TyrR, en el programa bioinformático BLAST, para localizar regiones de similitud entre secuencias de genes.

Se hizo un BLAST de la secuencia de aa de *tyrR* y del producto de su traducción en *Azospirillum* spp, tomando en cuenta los parámetros de identidad 100%-40.69%, cobertura de 100%-50% y E-value de 0.0-9e126, del filtro aplicado se seleccionaron 33 especies distintas y con el programa bioinformático Mega X se realizó el análisis de las relaciones evolutivas de *tyrR* (figura 3), se observó que TyrR de *A. brasilense* Sp7 se encontraba en una misma rama evolutiva con *A. baldaniorum*, *A. sp.* OGB3 y *A. formosense*.

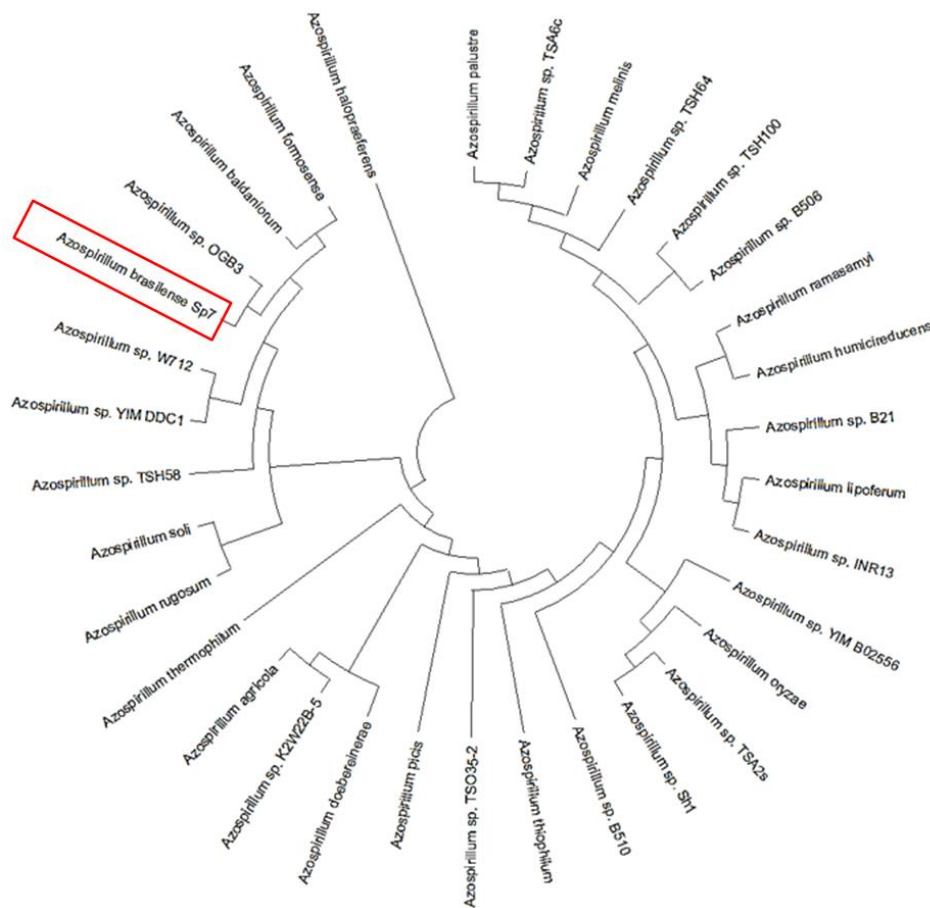


Figura 4. Árbol filogenético del género *Azospirillum* que poseen la proteína reguladora transcripcional TyrR. Parámetros: Identidad: 100%-40.69%, cobertura 100%-50%, E-value: 0.0-9e126. Programa utilizado MEGA X.

Se realizó nuevamente un BLAST que incluyera especies diferentes, el cual mostró cinco mil secuencias como resultado, aplicando las mismas especificaciones de parámetro de identidad 100%-40.69%, cobertura de 100%-50% y E-value de $0.0-9e126$ se filtraron 653 secuencias de especies diferentes. Las secuencias seleccionadas se ingresaron a la plataforma bioinformática Mega X para realizar un alineamiento de las mismas y posteriormente realizar la filogenia de la proteína TyrR (figura 5).

Familias	
█	Pseudomonadaceae
█	Rhodospirillaceae
█	Comamonadaceae
█	Halomonadaceae
█	Alteromonadaceae
█	Chromatiaceae
█	Pseudoalteromonadaceae
█	Idiomarinaceae
█	Shewanellaceae
█	Aeromonadaceae
█	Saccharopirillaceae
█	Psicomonadacea
█	Colwelliaceae
█	Morganellaceae
█	Pectobacteriaceae
█	Bruguerivoracaceae
█	Yersiniaceae
█	Hafniaceae
█	Erwiniaceae
█	Enterobacteriaceae

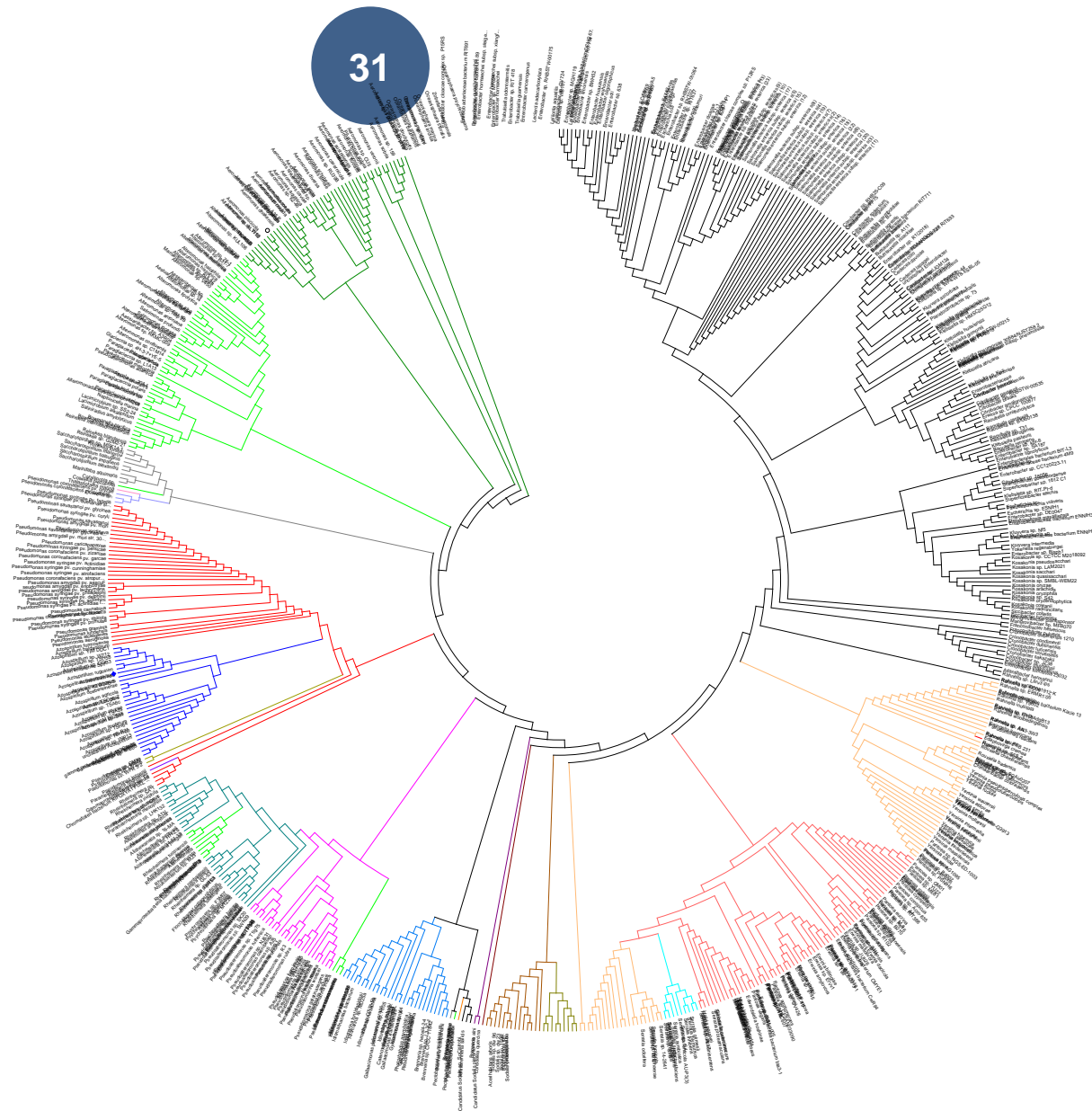


Figura 5. Árbol filogenético de 653 bacterias que poseen la proteína reguladora transcripcional TyrR. Parámetros: Identidad: 100%-40.69%, cobertura 100%-50%, E-value: 0.0-9e126. Se resalta la ubicación del *A. brasiliense* Sp7 dentro del árbol filogenético, se observa también a las familias que se encontraron en el análisis. Programa utilizado; MEGA X.

Se realizó una clasificación de las familias incluidas en el árbol filogenético y se encontró que TyrR de *A. brasilense* estaba flanqueado por la familia *Pseudomonadaceae* en ambos extremos, junto con otras familias de bacterias como *Comamonadaceae* y *Halomonadaceae*.

10.2 Análisis bioinformático de presuntas secuencias promotoras reguladas por TyrR en *A. brasilense*

El análisis de los promotores seleccionados, reportados por Jijón Moreno *et al* (2019), que están involucrados en la transducción de señales y/o quimiotaxis y movilidad, reveló que los promotores que codifican para el gen implicado en expresión de la proteína varilla del cuerpo basal flagelar FlgC y el gen que codifica para una proteína que contiene el dominio STAS, se encuentra el sitio de reconocimiento de σ^{54} , tabla 3, mientras que para el resto de promotores únicamente se localizaron secuencias de reconocimiento de σ^{70} .

	Gen	Ubicación	Caja TyrR (TGTAANG-TTTACA)	Tipo de σ	Secuencia	Score (-35, -10)	Distancia entre la secuencia σ y ORF
1	Proteína que contiene el dominio EAL	Cadena líder del cromosoma	<u>TGCAACCGCTCTGGATG</u>	70	<u>ACGAAGATCGAGCAGATCTGGGTATGAT</u>	-13 - 75	227 pb.
2	Enzima dependiente de fosfato piridoxal de clase I / II de aminotransferasa	Cadena líder del cromosoma	<u>CCGTACCACCTTGTGACCG</u>	70	<u>TTGACGGCATCGAGCTGACCGGCAACCT</u>	60 - 29	735 pb.
3	Proteína de unión a (Fe-S)	Cadena complementaria del cromosoma	<u>TGTTTCGCTTCTGTATG</u>	70	<u>GTGAAITTAGATTTTATTGGTAAAAG</u>	22 - 49	213 pb.
3'	proteína de quimiotaxis	Cadena líder del cromosoma	<u>TGTTTCGCTTCTGTATG</u>	70	<u>TTCAAAAAGATGGAAGAAGCTTTTACCAAAAT</u>	40 - 41	474 pb.
4	transportador MFS de eflujo de múltiples fármacos	Cadena complementaria del cromosoma	<u>TGAAACCATTTCCGTCCC</u>	70	<u>TTCCCTCACCCACGGGGCGGTGGTGCCT</u>	36 - 12	576 pb.
5	proteína UgpB de unión al sustrato transportador ABC sn-glicerol-3-fosfato	Cadena líder del cromosoma	<u>TGTGAAGATTGGTGACG</u>	70	<u>TTGACAGCTCCCCCTATCTTAAGGCT</u>	66 - 3	711 pb.
6	Regulador transcripcional de la familia MarR	Cadena complementaria del cromosoma	<u>CGTTACGCATTGGTCCG</u>	70	<u>CTGCCCTGCATTTTACACGACCAATAGACT</u>	21 - 37	24 pb.
6'	proteína de la familia de la fumariacetoacetato hidrolasa	Cadena líder del cromosoma	<u>CGTTACGCATTGGTCCG</u>	70	<u>TTGACTAGTCTATTGGTCGTGTAATAAT</u>	61 - 77	352 pb.
8	regulador de respuesta	Cadena líder del cromosoma	<u>TGGAATGTTTTCTTCCA</u>	70	<u>TTGTTAGGCTGATATTCGATTTTITAATAT</u>	45 - 65	234 pb.
9	sensor de histidina quinasa que contiene el dominio PAS	Cadena complementaria del cromosoma	<u>CGTCATGAATCGTTAACG</u>	70	<u>TTCTGTGCGGAGTCTTGAGCGGTATGTT</u>	5 - 54	9 pb.
10	Proteína de varilla del cuerpo basal flagelar FlgC	Cadena complementaria del cromosoma	<u>CGATCACGAACCTCTACA</u>	54	TGGAAGAGCAGATGCT		130 pb.
11	Proteína que contiene el dominio STAS	Cadena líder del cromosoma	<u>CCTTAAACGAATCCTTATA</u>	54	TGGCCACCCAGATGCG		250 pb.

Tabla 3. Tabla de promotores seleccionados implicados en la transducción de señales y/o quimiotaxis y movilidad. Tras el análisis de 126 cajas TyrR reportados por Jijón Moreno *et al* (2019) se seleccionaron 12 promotores de interés, se visualizan las características de presuntos promotores, los promotores que codifican para un gen implicado en la síntesis de una proteína varilla del cuerpo basal flagelar FlgC y un gen que codifica para una proteína que contiene el dominio STAS son los únicos que tienen un sitio de reconocimiento de σ^{54} .

El análisis se continuó con las dos secuencias promotoras que se presupone pueden estar involucradas en la regulación de la expresión de genes implicados en la transducción de señales y en la movilidad, pSTAS y pFlgC y que contienen el sitio de reconocimiento de σ^{54} . A través de la plataforma FIMO se partió de una secuencia consenso descrita: YGTAMMSRWWTSSKKTACR, a partir de cajas TyrR identificadas por Jijón Moreno *et al* (2019), en la región intergénica de los genes *dadA* y *tyrR*.

Una vez ubicadas las regiones promotoras se procedió al diseño de oligonucleótidos que amplificaran las regiones de interés (PFlgC10080F y PFlgC10080R), para lo que se introdujeron los sitios de restricción *HindIII* para Forward y *SpeI* para reverso, generando amplicones que se ubican dentro del parámetro establecido, es decir, en una longitud aproximada de 300 pb río arriba; para la región pFlgC fue de 216 pb y para la región pSTAS fue de 312 pb.

10.3 Análisis de la región promotora del gen que codifica la proteína varilla del cuerpo basal flagelar FlgC

La proteína varilla del cuerpo basal flagelar FlgC es una proteína importante para la formación del cuerpo basal la cual responsable de movilizar al filamento flagelar permitiendo a la bacteria desplazarse a favor del gradiente químico hacia concentraciones altas (quimiotaxis positiva) o hacia concentraciones más bajas (quimiotaxis negativa). A través del programa SMART se identificó que la proteína posee dos dominios de tipo estructural (Figura 6), Flg_bb_rod y Flg_bbr_C, formando parte del cuerpo basal que consta de 4 anillos (L, P, S y M) montados en un bastón central.

Un análisis más a detalle de la secuencia del posible promotor nos permitió visualizar los sitios de unión de la caja TyrR (80 pb) y el sitio de unión a σ^{54} (130 pb) (Figura 7) respecto al ORF.



Figura 6. Dominios de la proteína FlgC, componente del cuerpo basal del flagelo, en *A. brasilense* Sp7. Estos dominios son parte del cuerpo basal del flagelo, el cual consta de 4 anillos (L, P, S Y M).

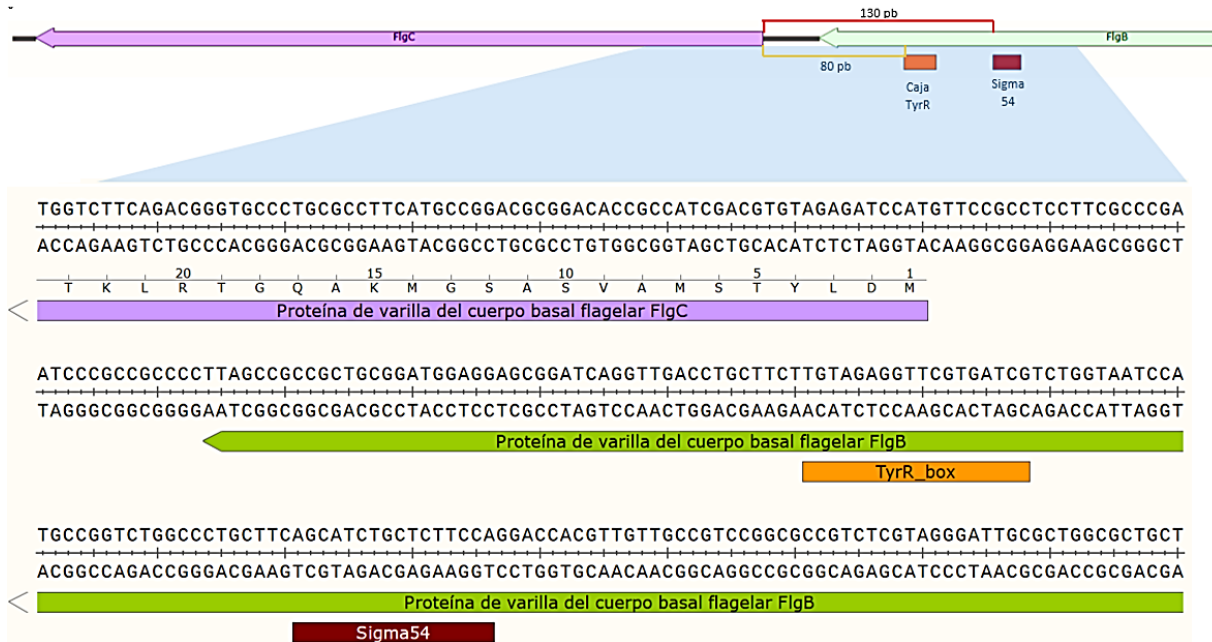


Figura 7. Análisis del presunto promotor para el gen *flgC*. Con la herramienta bioinformática SnapGene, es posible determinar la distancia de la caja TyrR respecto al ORF, así mismo como el sitio de unión a Sigma 54.

10.4 Análisis de la región promotora del gen que codifica para una proteína que contiene el Dominio STAS

El dominio STAS se encuentra en la región C- terminal de los transportadores de sulfato y los antagonistas del factor sigma bacteriano. Se ha sugerido que este dominio pudiera tener una función general de unión a NTP, (Figura 8). De la misma forma, con ayuda del programa SnapGene nos permitió localizar a la caja TyrR y al sitio de unión a σ^{54} en la secuencia promotora (Figura 9).

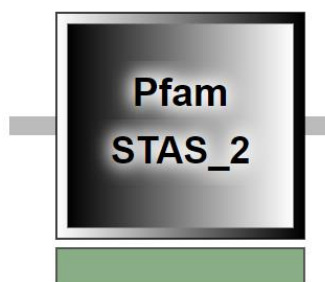


Figura 8. Dominio STAS_2 del gen STAS, que codifica para un factor anti-sigma en *A. brasilense* Sp7. Se ha sugerido que este dominio pudiera tener una función general de unión a NTP.

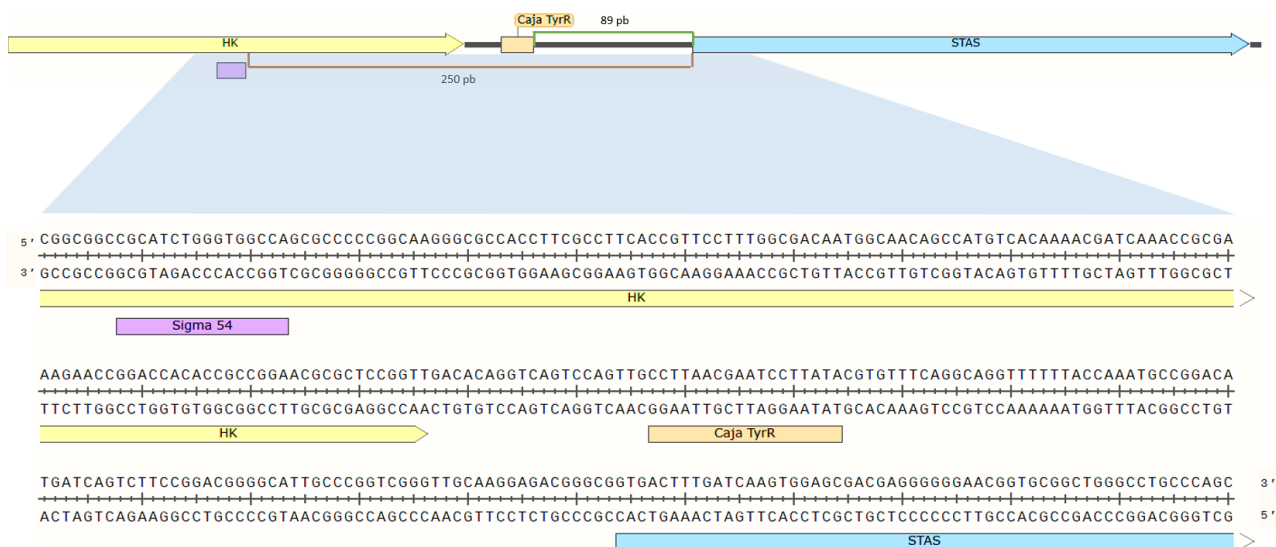


Figura 9. Análisis de la región promotora del gen STAS que codifica para un factor antisigma (STAS), una proteína que contiene el Dominio STAS. Se muestra la distancia de los sitios de la caja TyrR y sigma 54 respecto al ORF del gen.

10.4.1 Diseño de los oligonucleótidos y simulación de las construcciones en el vector pRU1156

Se diseñaron los oligonucleótidos para cada promotor de interés, el uso de las plataformas SnapGene y Oligoanalyzer tool nos permitieron diseñar cada uno con el propósito de que cumplieran con las características necesarias para obtener los amplicones deseados.

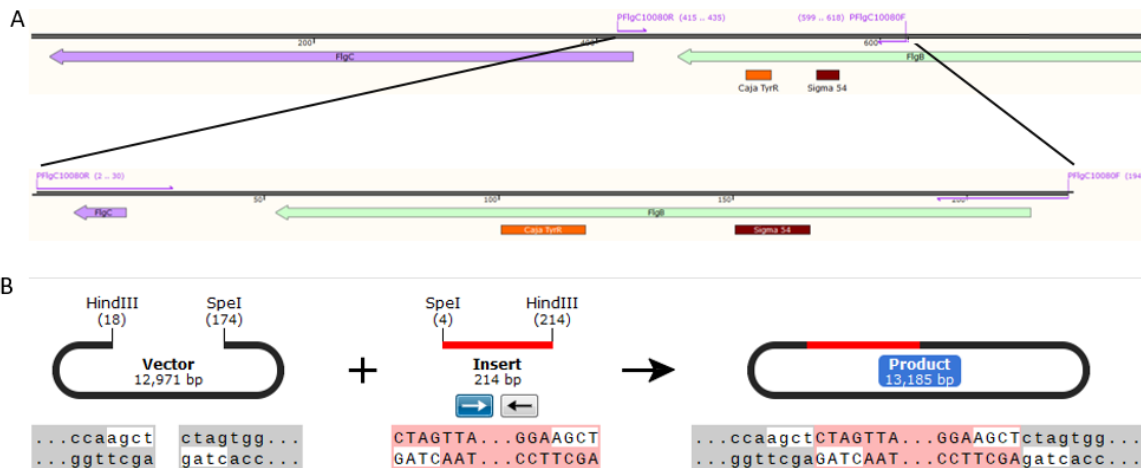
Primers PFlgC10080F y PFlgC10080R		
	Forward	Reverse
	CGAAGCTTCCAGCGCAATCCCTACGAGA	GTA CTAGT TAGAGATCCATGTTCCGCCTC
E. R	HindIII	SpeI
Largo	19	21
% G-C	60%	52.4 %
Tm	59.4 °C	56.1 °C
Delta G	-9.89 Kcal/mol	-5.38 Kcal/mol
Delta G Heterodímeros	-6.75 Kcal/mol	

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la región río arriba del gen *flgC*. Se presenta la secuencia y las características de los oligonucleótidos Forward y Reverse. La información fue obtenida en el servidor Oligoanalyzer Tool.

Primers PSTA02415F y PSTA02415R		
	Forward	Reverse
	CTAAGCTTAAGCGCATCGTCGAGCATCT	CGACTAGTAAGTCACCGCCCGTCTCCTT
E. R	<i>HindIII</i>	<i>SpeI</i>
Largo	20	20
% G-C	55 %	60 %
Tm	59.5 °C	61.2 °C
Delta G	-9.89 Kcal/mol	-3.61 Kcal/mol
Delta G Heterodímeros	-6.75 Kcal/mol	

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la región río arriba del gen *stas*. Se presenta la secuencia y las características de los oligonucleótidos Forward y Reverse. La información fue obtenida en el servidor Oligoanalyzer Tool.

Una vez diseñados los oligonucleótidos se procedió a hacer simulaciones del amplicón pRU11pFLgC y pRU11PSTAS, así como las construcciones en el vector pRU1156, con el propósito de determinar el tamaño de los amplicones y si la región amplificada era la deseada (Figura 10).



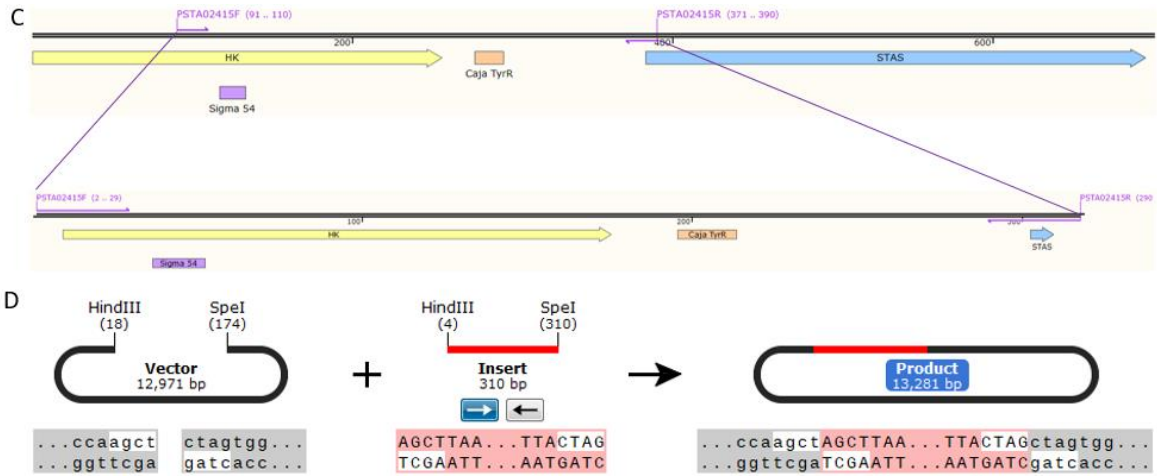


Figura 10. Simulación de las construcciones en el vector pRU1156. A través de la plataforma SnapGene se hicieron las simulaciones y se generaron los amplicones para pRU11pFLgC y pRU11PSTAS (A y C) respectivamente, con el uso de los oligonucleótidos previamente diseñados, obteniéndose productos de 221 pb para pFLgC y 317 pb para pSTAS. En B y D, se observa la simulación de las construcciones en el vector, primeramente se señala el tamaño del vector y el lugar donde se insertará el fragmento a insertar, seguido del fragmento a insertar y posteriormente el producto ya construido.

10.5 Comprobación por PCR de la región codificante de TyrR de la cepa *A. brasilense* Sp7 (1542 pb) y la cepa mutante *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus, 2465 pb).

Se partió de glicerol de las cepas *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus) de Saúl Jijón (2017) y del trabajo de Enrique Cruz de las cepas *A. brasilense* Sp7 pRU1156pFLgC y *A. brasilense* Sp7 pRU1156Pstas, (resultados no publicados).

Las células se crecieron en las condiciones reportadas y se realizó la técnica de extracción de ADN de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus) para realizar PCR y comprobar la presencia de la región codificante de *tyrR*, se preparó un gel de agarosa al 0.8% para correr las muestras y teñirlas, del cual se obtuvo un fragmento de 1542 pb para la cepa WT y un fragmento de 2465 pb para la cepa 2116 (*tyrR* minus) esto debido a la inserción de un casete de Gm en la región codificante de TyrR, Figura 11.

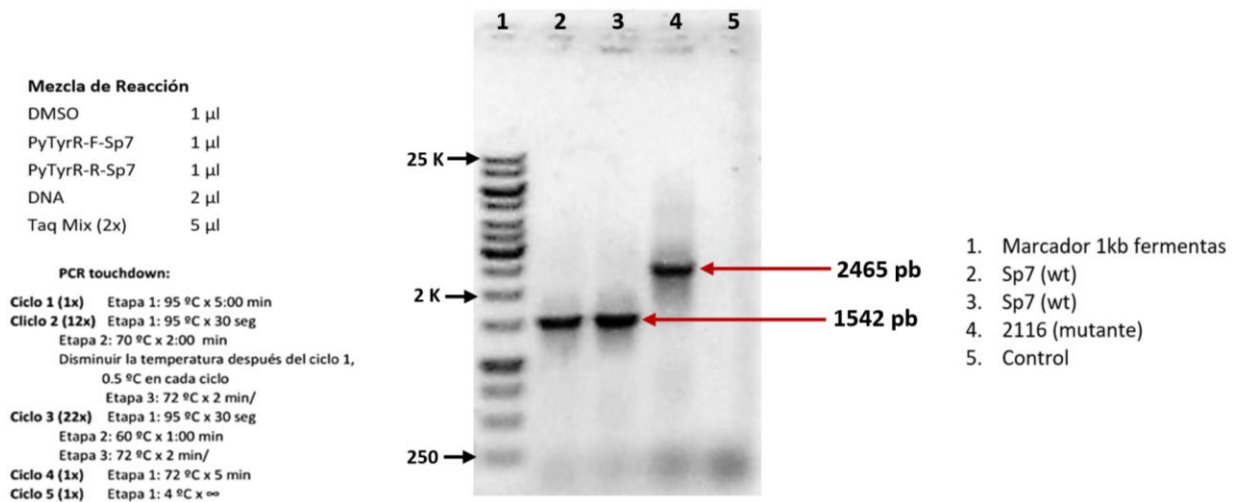


Figura 11. Comprobación por PCR de la región codificante de TyrR de la cepa *A. brasilense* Sp7. Se realizó un PCR con los oligonucleótidos PyTyrR-F-Sp7 y PyTyrR-R-Sp7 los cuales amplifican la región codificante de TyrR (1542 pb) y la cepa Mutante *A. brasilense* 2116 la cual tiene, en su lugar un casete de Gm (*tyrR* minus, 2465 pb), de glicerolés de Jijón (2017).

10.6 Comprobación de la presencia de promotores FlgC y STAS clonados en el plásmido pRU1156 en *A. brasilense* Sp7.

Para las cepas *A. brasilense* Sp7 pRU11pFlgC y *A. brasilense* Sp7 pRU11pSTAS de Enrique Cruz se corroboró la presencia de los promotores FlgC y STAS por PCR, por lo que se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico mediante el uso del Kit maxiprep de plásmido, como se indicó en la sección de Material y Métodos. Así mismo cada uno de los amplicones obtenidos se purificó con el kit Quiagen_tip. Con este ADN purificado se procedió a realizar la PCR, ensayo que mostró únicamente 2 bandas con un peso de 212 pb y 304 pb para pFlgC y pSTAS respectivamente (Figura 12) que corresponden a la longitud de los promotores reportados por Enrique Cruz.

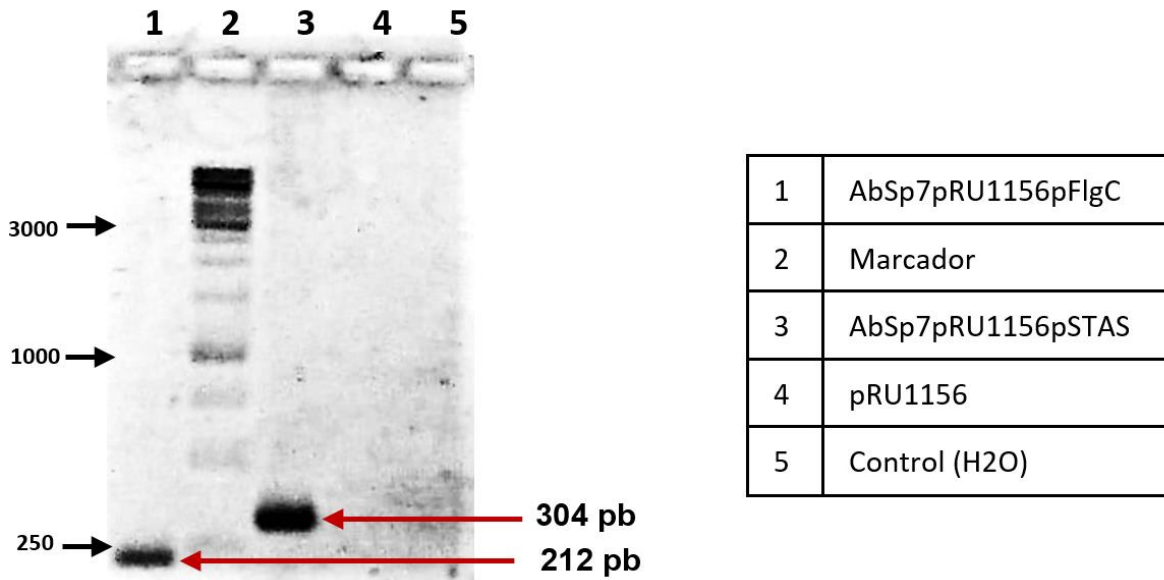


Figura 12. Comprobación de la presencia de promotores FlgC y STAS clonados en el plásmido pRU1156 en *A. brasilense* Sp7. Los productos se corrieron en un gel al 0.8% de agarosa. En el carril 1 se observa el tamaño del amplicón para pFlgC (212 pb), en el carril 3 a pSTAS (304 pb), el carril 4 es la muestra control del plásmido sin algún promotor, el carril 5 es la muestra control con H₂O, mientras que el carril dos tiene al marcador.

10.7 Comprobación de las construcciones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *A. brasilense* Sp7 mediante PCR

A partir de glicerolos de *A. brasilense* pRU11FlgC y *A. brasilense* pRU11STAS del trabajo que Enrique Cruz, (resultados no publicados) se realizaron las comprobaciones de las construcciones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos VFF y VFR (Tabla 2), que reconocen el plásmido pRU1156 a una distancia de 54 pb rio arriba y 343 pb rio debajo de la posición del promotor. Se obtuvieron amplicones de 660 pb y 756 pb respectivamente (Figura 13) demostrando la presencia de las regiones promotoras dentro del plásmido. Se colocaron dos controles negativos que fueron agua (Figura 13, carril 1) y el plásmido vacío (Figura 13, carril 5).

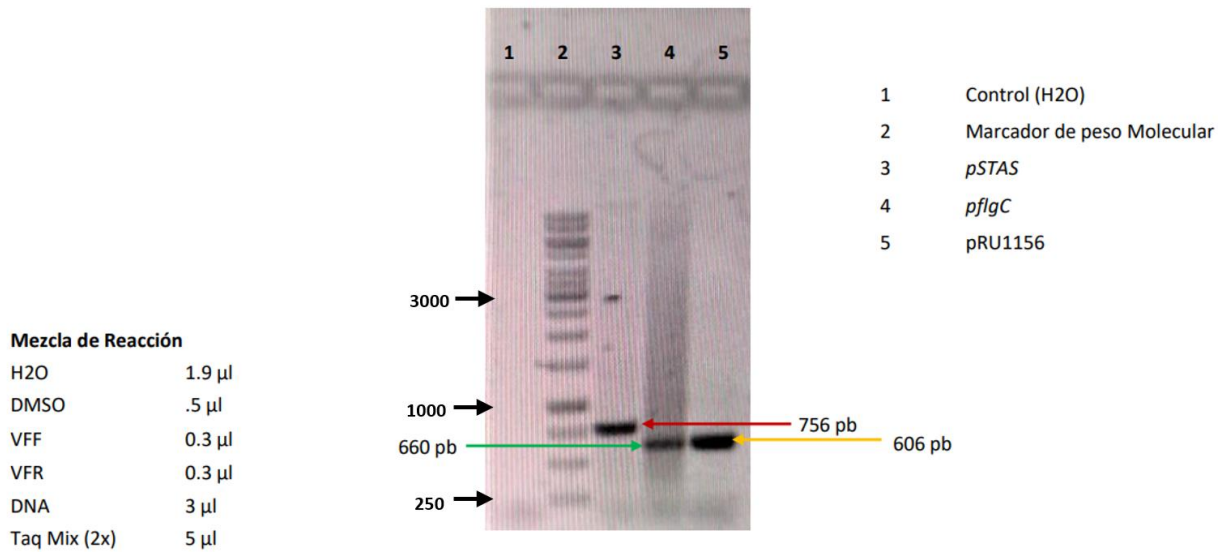


Figura 13. En el gel de agarosa al 1% se muestra el amplificado de los promotores de los genes *flgC* y *STAS* con los oligonucleótidos VFF y VFR, estos oligonucleótidos fueron diseñados para unirse a regiones que flanquean los promotores analizados, tomando sitios de unión que reconocen el plásmido pRU1156 a una distancia de 54 pb río arriba y 343 pb río debajo de la posición de los promotores, en el carril 5 se muestra al vector pRU1156 vacío, por lo que en el carril 3 y 4 se comprueba la presencia de los promotores *pSTAS* (756 pb) y *pFlgC* (606 pb), respectivamente, clonados en el vector pRU1156.

10.8 Extracción de DNA plasmídico por el método del Kit Maxiprep de plásmido Endofree.

Los amplicones correspondientes a los promotores de los genes *flgC* y *stas* fueron clonados en el plásmido pRU1156 y se generaron los plásmidos pRU11pFlgC y pRU11pStas, los cuales fueron incorporados por transformación a las cepas *E. coli* DH5 α y *E. coli* S17.1, respectivamente. De esta manera se obtuvieron las fusiones transcripcionales que nos permitió analizar la función de los promotores clonados en los fondos genéticos de *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 *tyrR* minus. Los plásmidos fueron purificados mediante el uso del Kit maxiprep de plásmido Endofree siguiendo el protocolo indicado para kit QIAGEN Plasmid Midi (Figura 14). Posteriormente se realizó un PCR para la comprobación de la presencia de los fragmentos esperados (Figura 15), para el cual se tomaron en cuenta dos controles negativos; agua en lugar de DNA y el plásmido pRU1156 vacío.

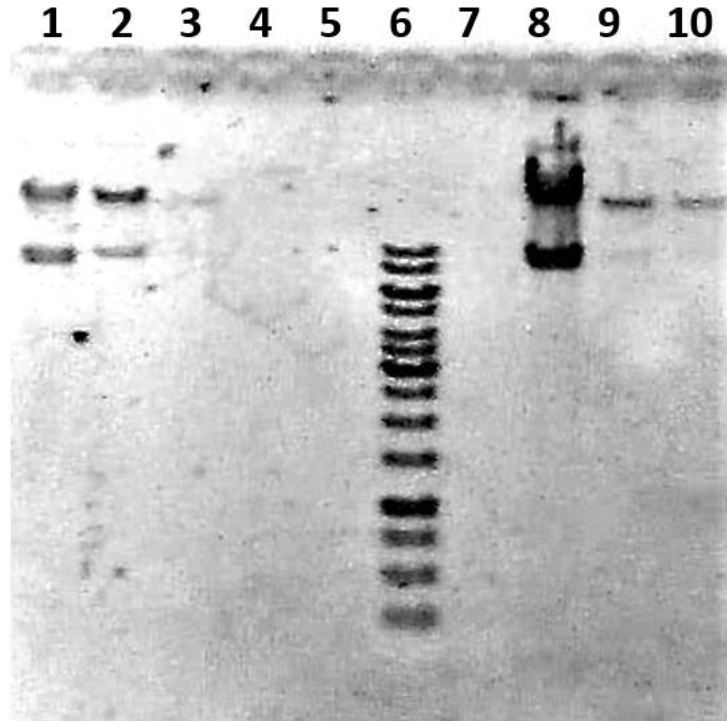


Figura 14. DNA plasmídico de las cepas *E. coli* DH5 α pRU1156pFlgC (carril 1-5) y *E. coli* DH5 α pRU1156pSTAS (7-10). Se recolectó el DNA de cada cepa en 6 tubos eppendorf de 1,5 ml, cada uno. Para determinar la presencia y concentración de ADN plasmídico recuperado se realizó una electroforesis, de la misma forma esta técnica nos permitió elegir la concentración de DNA que sería utilizado, de cada cepa para la comprobación de las construcciones pRU1156pFlgC y pRU1156pSTAS en *E. coli* DH5 α . Las concentraciones usadas fueron los de los carriles 3 y 10.

Una vez seleccionados las muestras con la concentración de DNA plasmídico correspondiente se realizó la PCR para identificar si las construcciones estaban presentes, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos VFF y VFR que generan los amplicones correspondientes para cada promotor; 660 pb para pRU11FlgC y 756 pb para pRU11STAS tal y como se observa en la figura 15.

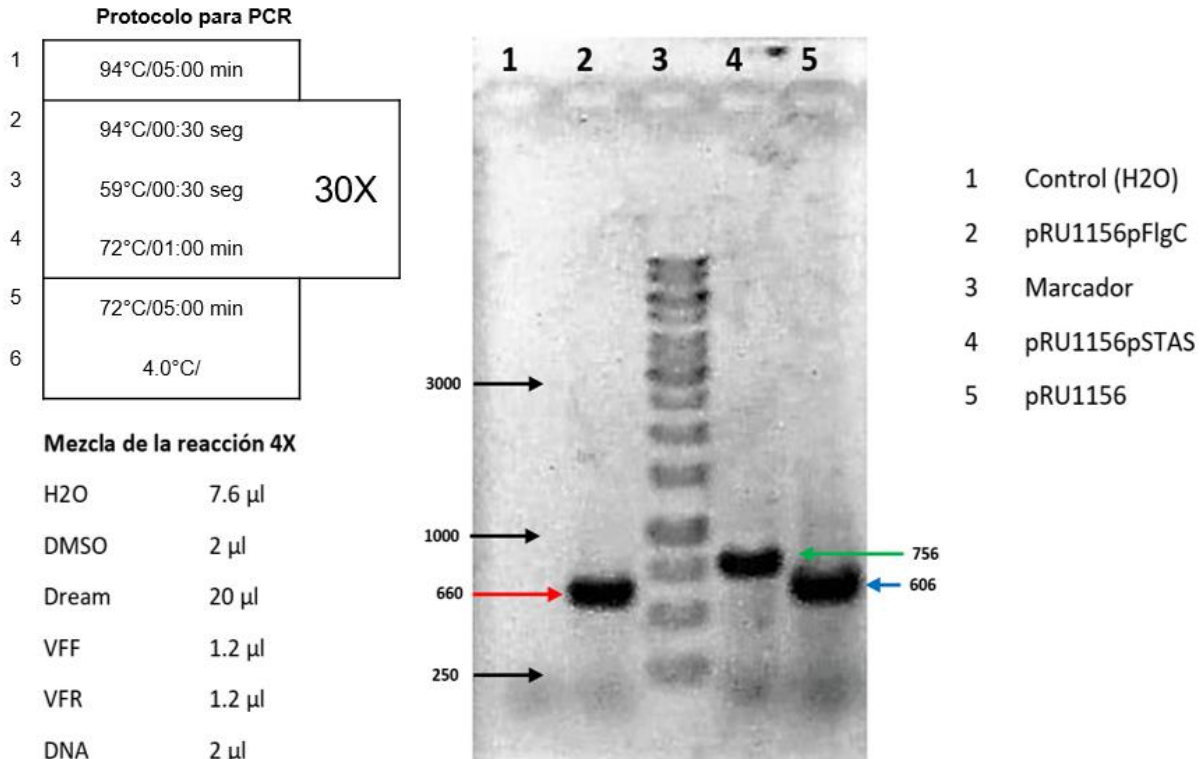


Figura 15. PCR de la presencia de las construcciones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *E. coli* DH5 α . Se muestra en el carril 2 al amplicón pRU11pFlgC y en el carril 4 al amplicón pRU11pSTAS de 660 pb y 756 pb respectivamente, los controles usados se encuentran en el carril 1 (agua) y el carril 5 (pRU1156)

10.9 Comprobación de la construcción de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *E. coli* DH5 α por patrón de restricción

Para corroborar la construcción de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *E. coli* DH5 α se comprobó mediante patrón de restricción con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, previamente a través de trabajo bioinformático se observó que dichas enzimas cortaban al plásmido en 2 segmentos de 4017 y 9172 pb para pRU $pflgC$ y de 4100 y 9174 para pRU $pSTAS$.

La Figura 16 muestra el resultado de la PCR donde se logran apreciar las restricciones realizadas dejando en evidencia que las construcciones si se llevaron a cabo en *E. coli* DH5 α

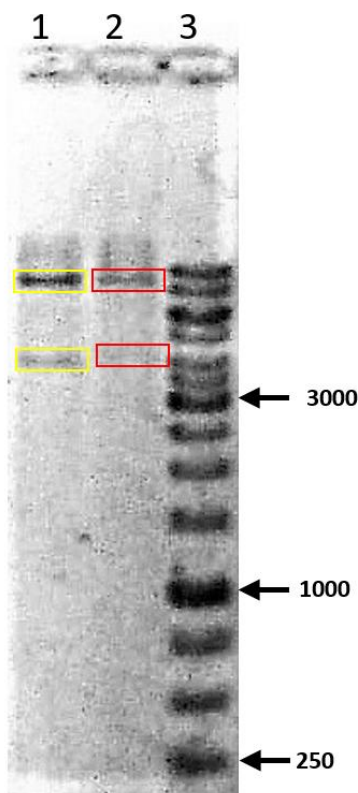


Figura 16. Comprobación de la construcción de pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *E. coli* DH5 α por patrón de restricción. En el carril 1 se observan los fragmentos de 4017 y 9172 pb para pRU11pFlgC y en el carril 2 de 4100 y 9174 para pRU11pSTAS, el carril 3 muestra a nuestro marcador de peso molecular.

10.10 Análisis de la expresión de fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) por microcopia de fluorescencia.

Se realizó el análisis de la expresión de la proteína GFP a las cepas *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 que contenían las fusiones pRU11pFlgC y pRU11pSTAS, para ello se estandarizó un protocolo que se aplicó a cada cepa con el propósito de observar la actividad de la GFP de manera cualitativa a través de la fluorescencia emitida.

El análisis mostró que en *A. brasilense* Sp7, con sus respectivas fusiones, presentaban fluorescencia de la GFP (Figura 17), mientras que en las cepas 2116 no se observó fluorescencia al mismo tiempo de crecimiento (Figura 18).

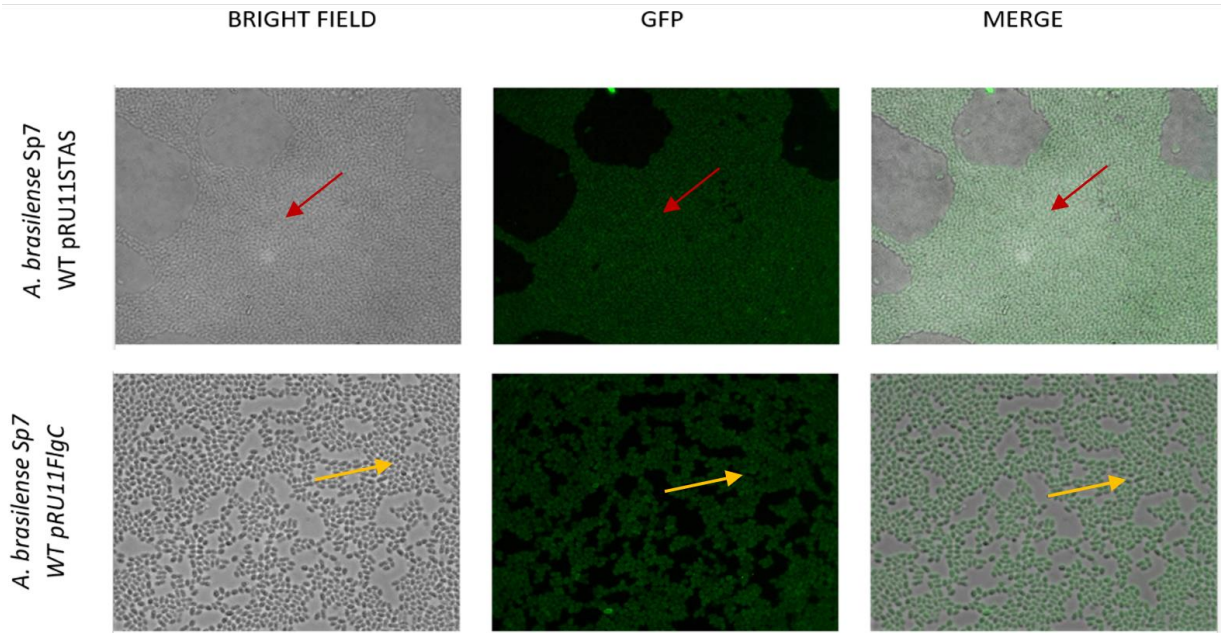


Figura 17. Microscopia de fluorescencia para la expresión de la GFP en *A. brasilense* Sp7 pRUpFlgC y pRUpSTAS. El análisis revela una fuerte expresión de la GFP en *A. brasilense* Sp7 con las fusiones pRUpFlgC (rojo) y pRUpSTAS (amarillo), después de 42 hr de crecimiento en medio K-malato con 3 $\mu\text{g/ml}$ de Tc, en agitación constante, 200 ml de medio se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min para observar al microscopio.

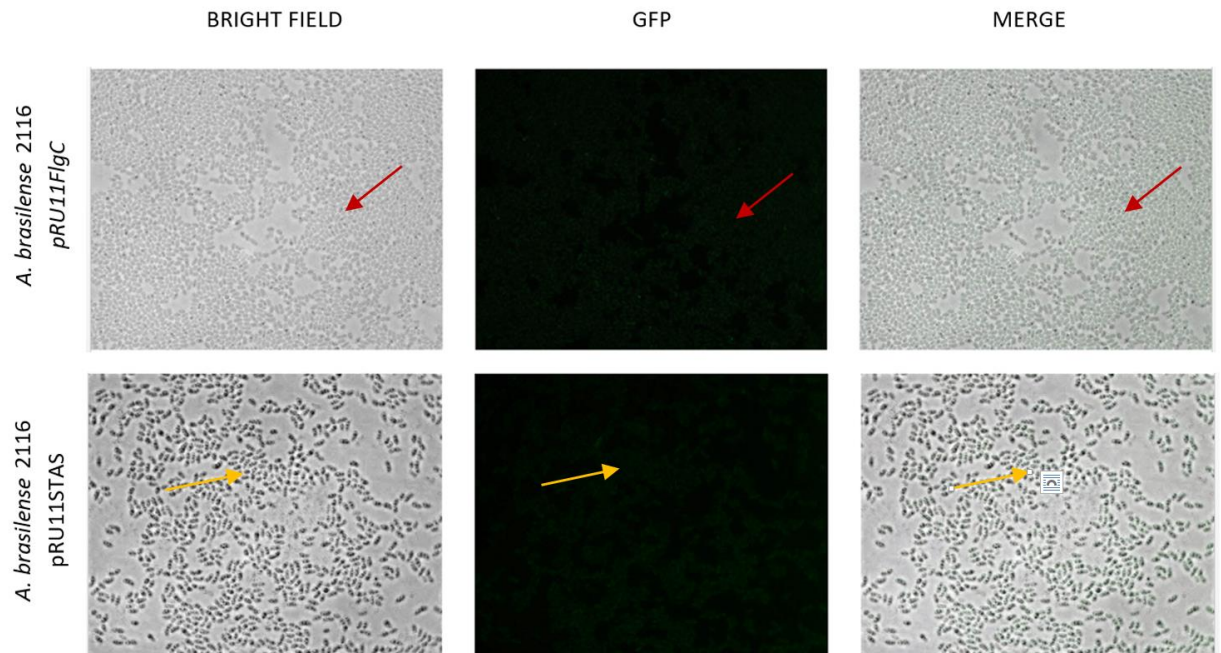


Figura 18. Microscopia de fluorescencia para la expresión de la GFP en *A. brasilense* 2116 pRUpFlgC y pRUpSTAS. El análisis revela que la expresión de la proteína es mínima en relación a la WT, después de 42 hr de crecimiento en medio K-malato con 3 $\mu\text{g/ml}$ de Tc y en agitación constante, 200 ml de medio se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min para observar al microscopio.

10.11 Análisis de la determinación de la β -Glucuronidasa

Para la actividad de la β -Glucuronidasa las construcciones de *A. brasilense* Sp7 pRU11pFlgC, *A. brasilense* Sp7 pRU11pSTAS, *A. brasilense* 2116 pRU11pFlgC y *A. brasilense* 2116 pRU11pSTAS, se crecieron en medio K-lactato con el antibiótico correspondiente durante 18 h en agitación constante y se continuo con el método descrito en la sección de material y métodos. Se calculó la media (valores de réplicas no mostrados) para cada ensayo y los datos se capturaron en una tabla, tabla 6.

Promedio de DO ₄₀₅ de los cuatro experimentos, tras la reacción enzimática con PNPG, con 100 μ l de muestra 30 minutos de reacción.								
	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
	DO ₄₀₅	DO ₆₀₀	DO ₄₀₅	DO ₆₀₀	DO ₄₀₅	DO ₆₀₀	DO ₄₀₅	DO ₆₀₀
Sp7FlgC	0.037	0.896	0.033	0.962	0.037	0.896	0.033	0.962
Sp7STAS	0.046	0.872	0.031	1.37	0.046	0.872	0.031	1.37
2116FlgC	0.051	1.018	0.054	0.918	0.051	1.018	0.054	0.918
2116STAS	0.087	0.86	0.103	1.18	0.087	0.86	0.103	1.18

Tabla 6. Reacción enzimática con PNPG. Se registraron los valores de los experimentos realizados tras la reacción enzimática con PNPG después de 30 minutos de reacción y tras tomar la DO a 405. Así como también se midió la DO₆₀₀ del crecimiento de las células.

Para la obtención de la actividad de la β -Glucuronidasa se utilizó la fórmula:

$$U - \beta - Glucuronidasa = \frac{DO * 100}{(\epsilon)(TRx \text{ minutos})(Vol. Rx \mu l)(mg \text{ de proteina/ml})}$$

Donde

DO= coeficiente de extinción molar de PNPG es de 0.018

TRx= tiempo de reacción, fue de 30 min

Vol. Rx= volumen de reacción, fue de 100 μ l (tabla 7).

Actividad enzimática UE/mg/mL de proteína de los experimentos realizados.	
CEPAS	Actividad enzimática UE/mg/mL de proteína
Sp7pRU11FlgC	0.166
Sp7pRU11STAS	0.307
2116pRU11FlgC	0.161
2116pRU11STAS	0.365

Tabla 7. Actividad enzimática de la β -Glucuronidasa. Se sustituyeron los valores en la fórmula para la obtención de la actividad de la β -Glucuronidasa

Los valores obtenidos se graficaron para poder realizar un análisis entre las cepas WT y la 2116 (figura 19), por lo que se utilizó una gráfica de barras para presentación de los datos. La actividad enzimática se normalizó con la cuantificación de proteínas totales como se describió en la sección de material y métodos.

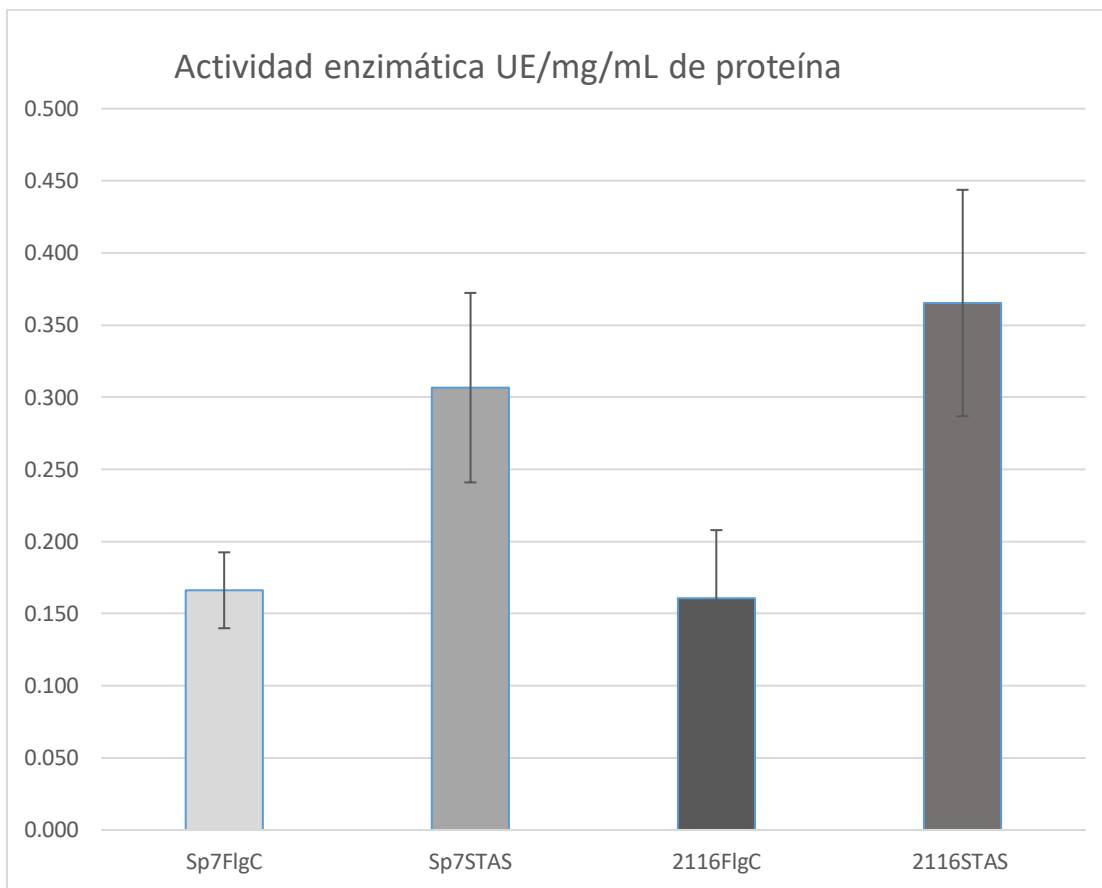


Figura 19. Actividad enzimática UE/mg/mL de proteína. Se muestran los resultados de los ensayos realizados para la determinación de la actividad de la β -Glucuronidasa para las construcciones *A. brasilense* Sp7pRU11pFlgC, *A. brasilense* Sp7pRU11pSTAS, *A. brasilense* 2116pRU11pFlgC y *A. brasilense* 2116pRU11pSTAS.

Los datos mostrados de la cuantificación de la actividad de la β -glucuronidasa no confirman a los obtenidos por la expresión del gen de la proteína GFP, ya que no indican diferencias significativas, entre las cepas WT y la mutante $\Delta tyrR$. Estos resultados deberán ser revisados en un futuro trabajo.

11. Discusión

Las bacterias del género *Azospirillum* pertenecen a la familia de las *Rhodospirillaceae*, las cuales están constituidas en un amplio grupo de hidrobacterias; procariotas originados en ambientes marinos, estos datos sugieren que *Azospirillum* pertenece a un grupo cuyo linaje deriva en sus inicios de ambientes acuáticos. El análisis de la secuenciación de *A. brasilense* y *A. lipoferum* y un tercer genoma de especie no definida reveló el alto grado de plasticidad del genoma de *Azospirillum* encontrando entre otras características un mayor reordenamiento genético (30). La falta de datos fósiles únicamente permite hacer una aproximación de la divergencia de *Azospirillum*, remontándolo a sus parientes acuáticos de la familia de las *Rhodospirillaceae*. Estos resultados fueron el punto de partida para hacer dos análisis Bioinformáticos de la proteína TyrR, que involucraron en primera instancia al género *Azospirillum* y posteriormente a aquellas bacterias que cumplieran con los parámetros establecidos. *tyrR* de *A. brasilense* Sp7, a pesar de ser un gen ortólogo, se esperaba que estuviera ubicado dentro de la familia de las *Rhodospirillaceae* Figura 4, sin embargo, el análisis filogenético lo ubica en medio de las familias *Pseudomonadaceae* y las *Enterobactereaceae* Figura 5, lo que sugeriría que como han descrito Wisniewski-Dyé et al, (2011), el gen *tyrR* fue adquirido por *Azospirillum* a través herencia horizontal, ya que estos autores han propuesto a partir de sus análisis realizados que, el 50 % de sus genes podrían haber sido adquiridos por estos mecanismos durante su transición del ambiente acuático al terrestre.

Aunque el análisis bioinformático realizado por Wisniewski-Dyé et al, (2011) reveló que casi la mitad de los genes que posee *Azospirillum* fueron adquiridos de manera horizontal, éstos estaban implicados principalmente en funciones específicas como mecanismos de defensa, biogénesis de pared celular, regulación de la transcripción, transporte y metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, iones inorgánicos y metabolitos secundarios, permitiéndoles adaptarse a ambientes rizosféricos, *tyrR*, que cumple funciones de mantenimiento, siendo un tipo de gen ancestral pudiese formar parte de estos genes transferidos por herencia horizontal por parte de la familia *Pseudomonadaceae* o *Enterobactereacea*.

La familia de los factores transcripcionales bEBPs tiene un papel importante en la regulación de funciones relacionadas con la transducción de señales, en procesos de movilidad, quimiotaxis, catabolismo de compuestos aromáticos, en bacterias la regulación de ciertos genes es crítica para determinar su supervivencia en ambientes de estrés (22).

Se ha reportado que el factor transcripcional TyrR cumple un papel importante para la regulación de genes implicados en la biosíntesis, transporte y degradación de aminoácidos. En primera instancia el análisis bioinformático realizado para la identificación de cajas *tyrR* en el genoma de *A. brasilense* Sp7, se obtuvo a partir de la secuencia consenso TGTAAG-N4-CTTTACA, reportadas por Jijón Moreno *et al* (2019) y obtenidas a partir de TyrR de *E. coli*, *Yersinia pestis* y *E. cloacae* con un 100% de identidad en cajas fuertes. El estudio se realizó con el objetivo de determinar la participación de TyrR en la biosíntesis de IAA, es decir, de la regulación transcripcional del gen *ipdC*. Derivado del análisis del genoma completo de *A. brasilense* Sp7 se identificaron sitios de unión putativos de TyrR en las regiones promotoras de ciertos genes (Tabla 3), lo que sugería que el gen es un regulador considerado regulador global y que los genes que eventualmente regula constituirían por tanto un regulón muy diverso según el modelo de bacterias en estudio (12, 22).

Estudios previos realizados en *E. coli* señalan que TyrR puede actuar como activador o represor de la expresión génica, dependiendo la posición de las cajas TyrR en relación con el sitio de unión de la ARN polimerasa. Estas cajas TyrR rio arriba del gen pueden ser fuertes o débiles dependiendo el grado de homología con la secuencia consenso, estas cajas fuertes presentan al menos 10/12 bases coincidentes con una simetría y secuencia espaciadora rica en AT, por otra parte las cajas débiles poseen menos de 10 bases que coinciden y su simetría es menor Tabla 3. La mayoría de genes descritos regulados por TyrR tienen más de una caja en la región promotora con al menos una caja fuerte (12, 22).

Con el propósito de conocer más acerca de la función y regulación transcripcional de TyrR en genes implicados en la transducción de señales y en la movilidad en *A. brasilense* Sp7, se realizó el análisis bioinformático de estas secuencias promotoras, buscando regiones con al menos una caja de unión a TyrR y sitios de unión a σ^{54} los

resultados nos permitieron seleccionar a pSTAS y pFlgC para su estudio, Tabla 3, Figuras 6, 7, 8.

En la secuencia promotora de pSTAS y pFlgC se ubicó a la caja TyrR, a 80 y 89 pb respectivamente rio arriba del ORF así como sitios de unión a σ^{54} y para comprender mejor el efecto de regulación que generaba la mutación *tyrR* generada por Jijón-moreno *et al.* (2019), se realizó la construcción y expresión de las fusiones transcripcionales pRU11pFlgC y pRU11pSTAS en *A. brasilense* Sp7 y *A. brasilense* 2116 (*tyrR* minus) para analizar el comportamiento de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), la cual no requiere de un cofactor para su expresión, permitiendo su detección a nivel unicelular mediante un ensayo no destructivo (5), verificando de forma cualitativa que los promotores *pflgC* y *pstaS*, se expresan en el fondo genético de la cepa silvestre mientras que en la mutante no hay expresión (figura 17 y 18), por lo que sugiere que TyrR está implicado en la regulación de la expresión genética de los genes implicados en la movilidad y transducción de señales, *flgC* y *staS*, respectivamente. Datos relevantes ya que ambos genes que, de manera presuntiva codifican para proteínas que estarían implicadas en la formación del flagelo polar, el cual se sabe que participa en la formación de biopelícula (29); en tanto el gen *staS* codifica para un factor antisigma que ha sido implicado en la regulación genes que participan en funciones asociadas a mecanismos de estrés osmótico (21). Es interesante también incluir a los genes AMK58_RS10265 y AMK58_04505, que codifican para una cinasa histidínica y una proteína aceptora de metilo (MCP), respectivamente. Ambos genes al parecer participando en señalización debido a que sus promotores fueron activados por TyrR (Cruz E, resultados no publicados), tal como se describió en *Enterobacter ludwigii* UW5, (6). Tras un análisis de secuencia y genómica comparativa en *Shewanella* spp., se predijo un gen TyrR ortólogo que controlaría 35 genes abarcando 16 operones, del cual se deduce que en *Shewanella* spp, *E. ludwigii* y *A. brasilense* Sp7 han experimentado una expansión del regulón TyrR, en el caso del modelo de estudio *Azospirillum* los datos apuntan a que TyrR regula funciones relacionadas con la interacción bacteria-planta (6).

La cuantificación de la actividad de la β -Glucuronidasa proporcionó datos diferentes a los esperados y, a los obtenidos por la expresión del gen de la proteína GFP, ya que

no se detectaron diferencias significativas entre la cepa WT y la mutante *tyrR*. Se ha descrito que la expresión de los promotores de TyrR requieren de la activación del dominio de señalización ACT, en el caso de *E. coli* la activación se observa por la presencia de fenilalanina y la represión por la tirosina (15), en nuestro estudio el ensayo se realizó en medio mínimo. Es posible que la expresión de la β -glucuronidasa no se haya observado debido a una transcripción del nivel basal por lo que para determinar la posible regulación de TyrR de estos genes sería necesaria la incorporación de aminoácidos en un trabajo posterior.

12. Conclusiones

El gen *tyrR* está altamente conservado en el género *Azospirillum* y pudo haberse obtenido por herencia horizontal durante el proceso de transición del ambiente acuático al terrestre.

TyrR de *A. brasilense* Sp7, es un regulador que se consideraría regulador global y que los genes que regula constituirían un regulón.

13. Perspectivas

Un análisis global de los genes que podrían ser regulados por TyrR, sería un análisis de RNAseq, nos indicaría los genes y las proteínas reguladas por este regulador, y las vías implicadas.

14. Anexo

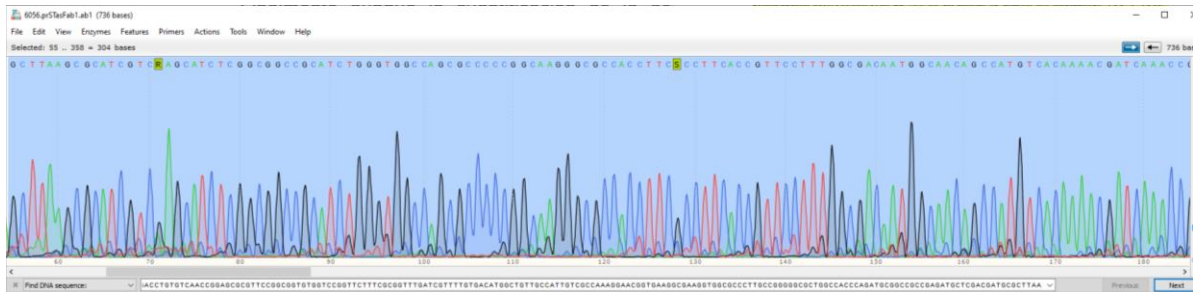


Figura S 1. Cromatograma de secuenciación del promotor STAS. Análisis de la secuencia promotora STAS, la secuencia corresponde a 304 pb que previamente fueron analizadas *in silico* con los iniciadores VFF y VFR.



Figura S 2. Cromatograma de secuenciación del promotor FlgC. Análisis de la secuencia promotora STAS, la secuencia corresponde a las 304 pb previamente analizadas *in silico* con los iniciadores M13.

15. Bibliografía

1. Bioiberica. (2009). Aminoácidos en los exudados radiculares. *Bioiberica*. Recuperado de <https://www.planthealth.es/noticias/conocimiento-aplicado/aminoacidos-en-los-exudados- radiculares>

2. Bush, M., and Dixon. (2012) R. "The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ_{54} -dependent transcription." *Microbiology and molecular biology reviews*, PUBMED. 78 (3). 497-529.
3. Briseño, K. (2021) "¿Qué es la quimiotaxis?" *Lifeder*, Recuperado de www.lifeder.com/quimiotaxis/.
4. Briceño K. (2019). Rizosfera; características, microbiología e importancia. *Lifeder*. Recuperado de <https://www.lifeder.com/rizosfera/>
5. Coulson TJD, Patten CL. (2015) The TyrR transcription factor regulates the divergent *akr-ipdC* operons of *Enterobacter cloacae* UW5. *PLoS ONE* 10(3)
6. Coulson, T.J.D., Malenfant, R.M., Patten, C.L., (2021). Characterization of the TyrR regulon in the rhizobacterium regulon in the rhizobacterium *Enterobacter ludwigii* UW5 reveals overlap with the CpxR envelope stress response. *Journal of bacteriology*, 203(1)
7. Etimología de la Rizosfera. (2022). "Rizosfera." *Etimologías de Chile* – Recuperado de Biología de la rizosfera
8. Gorriti M., F., Moreno J., R. (2014). Secuencias reguladoras de la transcripción en procariontes. *Reduca (Biología)*. 7 (5):15-28.
9. Gutiérrez R. R. (2004). "Introducción a la regulación del inicio de la transcripción y circuitos genéticos." *Unam*, p. 31, smcg.ccg.unam.mx/enp-unam/05-TranscripYRegulacion/GutierrezRM_Regulacion.pdf.
10. Herrera S. K., and Studdert C. (2008). "Quimiotaxis otras yerbas." *Ciencia.*, www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy105/quimiotaxis.htm.
11. Infoagro. (2019) ¿Qué es la rizosfera? *InfoAgronomo*. Recuperado de <https://infoagronomo.net/que-es-la-rizosfera/>
12. Jijón-Moreno, Saúl, *et al.* (2019). "TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7." *PLOS ONE*, vol. 14, no. 2.
13. Joly N, Zhang N, Buck M, Zhang X. (2012). Coupling AAA protein function to regulated gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*
14. Karunakaran R, Mauchline TH, Hosie AH, Poole PS. (2005). A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter

- proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology (reading england)*, 151 (10). 3249-3256.
15. Kwok, T., Yang, J., Pittard, A. J., Wilson, T. J., & Davidson, B. E. (1995). Analysis of an *Escherichia coli* mutant TyrR protein with impaired capacity for tyrosine-mediated repression, but still able to activate σ^{70} promoters. *Mol. Microbiol*, 17(3), 471–481.
 16. Lorenzo F. (2015) “Componentes y funciones de la matriz de los biofilms bacterianos.” *Blog sobre seguridad alimentaria*. Recuperado de www.betelgeux.es/blog/2015/03/10/componentes-
 17. Loredó-Ostí C, López-Reyes L, Espinosa-Victoria D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Tierra Latinoamericana* [Internet]. ; 22(2):225-239.
 18. Moreno R, A, Carda M V, Reyes C. J. L, Vásquez A. J, Cano R P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. colomb. biotecnol*; 20(1): 68-83.
 19. Nazar, Julio. (2007) “Biofilms bacterianos Bacterial biofilms.” *Revisión Bibliográfica Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*, vol. 67, pp. 61–72.
 20. Oliveros-Bastidas, Alberto de J., et al. (2009). “Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas.” *Química Nova*, 32 (1), 2009, pp. 198–213.
 21. Ortega-Peña, Silvestre, & Edgar Hernández-Zamora. (2019). “Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento.” *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 74 (2). Pp 79-88.
 22. Patten C.L. (2022.) Rhizocompetence traits regulated by the transcription factor TyrR in plant-associated bacteria. *Elsevier*, 23. 10057
 23. Pedraza R. O. et al. (2020). Beneficial microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi. *Elsevier, academic press*, pp. 73–105.
 24. Probanza L. A. (2012). “La rizosfera: un “criptoecosistema” vital. Aspectos básicos y aplicados.” *Congreso nacional del medio ambiente*. Recuperado de infoagronomo.net/que-es-la-rizosfera/.
 25. Reyes J. I. (2011). La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: Comunidad microbiológica dinámica del suelo. *UNAM*. 17-23.

26. Ugr. (2006). Regulación génica. Microbiología general. *Universidad de granada*. Recuperado de www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/15regulacion.htm.
27. Velasco-Jiménez, A, Castellanos-Hernández, Osvaldo, Acevedo-Hernández, G, Aarland, R C, & Rodríguez-S, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 333-345.
28. Velasco Casal, P. (2008). Papel de la quimiotaxis en el transporte bacteriano y la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos. *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS)*. Recuperado de digital.csic.es/handle/10261/96962
29. Viruega-Góngora V, Acatitla-Jácome I. S, Reyes-Carmona S R, Baca B E, Ramírez-Mata A. (2020). Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense*, *FEMS Microbiology Letters*, 367 (4),
30. Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K., Khalsa-Moyers, G., *et al.* 2011. (2011). *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS genetics*, 7(12).

