



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

POSGRADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**“Modelado estructural de las proteínas MibR y LibR en
interacción con la región promotora del gen *ipdC* de
Azospirillum brasilense Sp7 y estrategias de
purificación de la proteína LibR”**

TESIS

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCION EN BIOQUIMICA MICROBIANA**

PRESENTA

I.B.T Shirley Xoco Quintana

ASESOR DE TESIS

DC. Sandra Raquel Reyes Carmona

Puebla, Pue Agosto 2023



BUAP

Oficio No. PM/073/2023

Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza
Director General de Bibliotecas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Presente.

A través de este medio me dirijo a usted para informarle que la tesis con título **Modelado estructural de las proteínas MibR y LibR en interacción con la región promotora del gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y estrategias de purificación de la proteína LibR**, ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto, se autoriza la impresión de la tesis de la alumna;

Nombre de la alumna: Shirley Xoco Quintana
Matrícula: 221470085
Facultad: Instituto de Ciencias
Programa educativo: Maestría
Posgrado: Maestría en Ciencias (Microbiología)

Sin más por el momento, agradezco la atención al presente.



D.C. Carolina Morán Raya
Directora Instituto de Ciencias

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 7 de julio 2023.

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona
Directora de tesis

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>Azospirillum sp.</i>	2
El ácido indol-3-acético (AIA)	2
Regulación del gen <i>ipdC</i> en bacterias	5
Regulación transcripcional del gen <i>ipdC</i> en <i>Azospirillum brasilense</i>	5
ANTECEDENTES DIRECTOS	6
LuxR en <i>Azospirillum</i>	8
FlcA.....	9
EraR	10
MibR: Un regulador transcripcional de la familia MarR.....	10
Mutantes de los genes <i>libR</i> y <i>mibR</i>	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivos Específicos.....	17
ESQUEMA DE TRABAJO	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Material biológico empleado	19
Análisis Bioinformáticos	20
CLUSTAL OMEGA.....	20
MULTIPLE ALING SHOW	20
SWISS-MODEL	21
UCSF CHIMERA.....	22
STRING.....	22
Análisis Experimentales.....	24
Medios de cultivo.....	24
Características de las fusiones traduccionales de las proteínas MibR y LibR	24

Expresión de las proteínas híbridas GST-MibR y GST-LibR en la cepa BL21.	24
Evaluación de diferentes condiciones de inducción en <i>E. coli</i> BL21	25
Evaluación de tiempos de inducción.....	25
Evaluación de temperatura.....	25
Evaluación de concentración de inductor.....	26
Evaluación de D.O (densidad óptica)	26
Evaluación de la expresión en una cepa alternativa.....	26
Verificación de la cepa donada de Cinvestav <i>E.coli</i> Rossetta pLysS.....	27
Células competentes.....	27
Minipreparaciones	27
Transformación (Choque térmico).....	28
Ensayos de expresión en <i>E. coli</i> Rosseta pLysS	28
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	28
Tinción de geles de poliacrilamida (Coomassie)	29
Western Blot	29
RESULTADOS.....	30
RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS	30
Modelado por homología	30
Proteína LibR	30
Proteína MibR	31
Posible interacción <i>in silico</i> entre las proteínas MibR y LibR.....	31
Búsqueda bioinformática en la plataforma STRING	32
Análisis de la proteína LibR en la plataforma STRING.....	32
Análisis de la proteína MibR en la plataforma STRING	34
.....	34
Identificación de los posibles sitios de unión entre las proteínas LibR y MibR al ADN a través de análisis <i>in silico</i>	35
Análisis de la secuencia de la proteína LibR.....	35
Análisis de la secuencia de la proteína MibR	37
Sitios que mutar en la región promotora del gen <i>ipdC</i>	37
Propuesta de mutaciones para LibR	37
Propuesta de mutaciones para MibR.....	39
RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	41
Evaluación de distintas estrategias para la purificación de LibR.	41

Inducción de la proteína en <i>E. coli</i> BL21	41
Estrategia alternativa para la purificación de LibR.	43
Extracción del plásmido pGEXGST-libR de la cepa BL21	43
Transformación pGEXGST-libR en <i>E. coli</i> Rosetta pLysS.....	44
Inducción de la proteína LibR en <i>E.coli</i> Rosetta pLysS	44
Tabla 3. Condiciones evaluadas de inducción de la proteína LibR en <i>E. coli</i> Rosetta pLysS.....	44
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto de la señalización mediada por Acido indol acético (AIA) en la asociación de un microorganismo con una planta	3
Figura 2. Rutas de biosíntesis de Acido indol acético (AIA) en bacterias.....	4
Figura 3. Región promotora del gen <i>ipdC</i>	6
Figura 4. Identificación de proteínas en unión a la región promotora del gen <i>ipdC</i>	7
Figura 5. Dominios identificados en la secuencia de la proteína LibR, mediante el análisis en la plataforma SMART protein	7
Figura 6. Dominios identificados en la secuencia de la proteína MibR	11
Figura 7. Producción de AIA por cepas de <i>A. brasilense</i> Sp7 y cepas mutantes.	12
Figura 8. Análisis de la expresión del gen <i>ipdC</i> en cepas de <i>A. brasilense</i>	13
Figura 9. Modelo propuesto de la regulación transcripcional de <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> Sp7.....	14
Figura 10. Modelado por homología de la proteína LibR (WP_035678594.1) de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	30
Figura 11. Modelado por homología de la proteína MibR (WP_035678594.1) de <i>A. brasilense</i> Sp7	31
Figura 12. Genomas de <i>Azospirillum</i> ssp. cargados en la plataforma STRING recientemente.	32
Figura 13. Análisis de las proteínas con alta identidad con LibR	33
Figura 14. Análisis de la interacción de la proteína FlcA de <i>A. brasilense</i>	34
Figura 15. Análisis de las proteínas con alta identidad respecto a MibR.....	34
Figura 16. Análisis de la interacción de la proteína homologa a MibR de <i>A. brasilense</i>	35
Figura 17. Alineamiento de secuencia de la proteína LibR contra proteínas homologas.....	36
Figura 18. Alineamiento de secuencia de la proteína MibR contra CouR proteína homologas	37
Figura 19. Análisis de la secuencia palíndrome presente en la región promotora del gen <i>ipdC</i> de <i>A. lipoferum</i> y <i>A. brasilense</i>	38
Figura 20. Análisis de secuencias de Interacción entre el ADN y los reguladores transcripcionales.....	39
Figura 21. Análisis de secuencia invertida repetida en <i>Azospirillum</i> sp. y <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	40
Figura 22. Modelado por homología de MibR.	40
Figura 23. Análisis de inducción de la proteína LibR en <i>E. coli</i> BL21.....	42
Figura 24. Gel resultante del SDS-PAGE de LibR en BL21.	42
Figura 25. Resultado de la electroforesis de la lisis alcalina de <i>E. coli</i> BL21.	43
Figura 26. Resultado del SDS-PAGE, gel de acrilamida al 10%.....	45
Figura 27. Resultado del western blot. Se utilizó el anticuerpo anti-GST.....	45

Puebla, Puebla, México. Junio 2023.



BUAP

El presente trabajo forma parte de las líneas de investigación del Laboratorio de la Interacción batería-planta del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias-Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP). Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 del edificio IC11 en Ciudad Universitaria.



ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AIA: Acido indol acético
Amp: Ampicilina
AuxRE: Elemento de respuesta a auxinas
Ufc: unidades formadoras de colonias
DO: Densidad óptica
EMSA: Ensayo de cambio en la corrida electroforética
gltX: Gen que codifica para un glutamato tRNA ligasa
HTH: Dominio hélice giro hélice.
IAN: Indol-3-acetonitrilo
IAM: Indol-3-acetamida
ipdC: Gen que codifica la enzima indolpiruvato descarboxilasa
IPyA: Acido indol-3-pirúvico
KDa: Kilodaltones
Km: Kanamicina
LB: Luria Bertani
LibR: LuxR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator
mg: miligramos
MibR: MarR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator
mL: mililitros
pb: Pares de bases
PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas
PPDC: Enzima fenilpiruvato descarboxilasa
QS: Quorum Sensing
REC: Dominio involucrado en regulación de respuesta
TAM: Triptamina
wHTH: Hélice-giro-hélice alado

RESUMEN

Azospirillum brasilense es una rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas, (PGPR, por sus siglas en inglés **Plant Growth Promoting Rhizobacteria**), este tipo de organismos son atraídos por las rizodeposiciones de las plantas y colonizan el tejido de la raíz estableciendo una relación de simbiosis con la misma y mejorando la calidad del suelo mediante procesos como la fijación de nitrógeno, control de fitopatógenos, protección contra estrés abiótico y síntesis de fitohormonas. Dentro de estos beneficios la producción de fitohormonas por las PGPR's se considera uno de los mecanismos más importantes por los cuales se promueve el crecimiento de las plantas y en su mayoría se da por la producción de la auxina llamada ácido indol 3 acético (AIA), que es una hormona vegetal capaz de regular procesos fisiológicos importantes tanto en la bacteria como en las plantas con las que interactúa y la biosíntesis de AIA en *Azospirillum* principalmente se lleva a cabo a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP). La enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC) es codificada por el gen indolpiruvato descarboxilasa (*ipdC*). Así que el aporte de nuevos hallazgos sobre la regulación transcripcional del gen *ipdC* que codifica para la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC), y responsable de hasta el 90% de la producción de AIA nos permitirá comprender el mecanismo empleado por *Azospirillum brasilense* para su biosíntesis. Previo a este trabajo en el laboratorio de la interacción bacteria planta, a través de ensayos de cromatografía de afinidad y MALDI-TOF se identificó en *A. brasilense* Sp7 la presencia de dos proteínas unidas a la región promotora del gen *ipdC*, estas proteínas correspondieron a un regulador transcripcional de la familia LuxR y a un regulador transcripcional de la familia MarR, las cuales fueron nombradas LibR (por LuxR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator) y MibR (por MarR-family indole-3-acetic acid biosynthesis regulator). En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis bioinformático para recabar información acerca de las características estructurales y funcionales de ambas proteínas (LibR y MibR). Para ello se realizaron modelados por homología, a partir del regulador de respuesta DosR de *Mycobacterium tuberculosis* para LibR y el represor transcripcional CouR de *Rhodopseudomonas palustris*. A partir de estos modelados, se infiere que ambas proteínas funcionan en homodímeros, y que la proteína LibR tiene conservados los aminoácidos blancos de fosforilación con respecto a otros miembros de la familia LuxR, así como y la lisina 182 responsable de la unión al DNA en las secuencias consenso.

Por otro lado, la proteína MibR no tiene una identidad conservada alta en su secuencia de aminoácidos con otros miembros de esta familia, La información recopilada y el modelado de las proteínas sugiere que no hay una posible unión entre sus monómeros o dímeros, ya que los residuos de unión son muy específicos para cada familia y para cada proteína. Debido a que no se logró encontrar información acerca de una posible unión de estas proteínas se utilizó la plataforma STRING como otra herramienta para verificar posibles interacciones entre estas proteínas u homólogos de estas familias. Por otro lado, se proponen sitios a mutar dentro de la secuencia palíndromo de la región promotora del gen *ipdC* en las cuales ambas proteínas de interés podrían utilizar para su interacción con el DNA. Finalmente, en cuanto a la parte experimental se probaron diferentes condiciones para lograr una mayor cantidad de proteína LibR purificada disminuyendo que dicha proteína se fuera a cuerpos de inclusión.

INTRODUCCIÓN

Azospirillum sp.

El género *Azospirillum* constituye un subcluster dentro de la familia *Rhodospirillaceae*. Estas bacterias son células no formadoras de esporas con forma de varilla en espiral o ligeramente curvadas con gránulos de polihidroxibutirato que pueden formar quistes. La tinción de Gram es negativa y las células son muy móviles con un solo flagelo polar y varios flagelos laterales de longitud más corta (peritrica). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se han destacado por su potencial de aplicación en la producción vegetal, permitiendo la reducción del uso de fertilizantes y pesticidas, lo cual se debe a la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas mediante la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas, tales como ácido indol-3-acético (AIA) (de Andrade et al., 2019). Capaces de utilizar varios recursos de carbono como: glucosa, lactato, succinato, fructosa, malato, piruvato y fumarato (Zhou et al., 2009). Forma parte de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) ya que influyen en la salud y la productividad de las plantas mediante una variedad de mecanismos que implican la solubilización de nutrientes minerales, la estimulación del crecimiento y la supresión de enfermedades de las raíces. La producción de fitohormonas por PGPR ahora se considera uno de los mecanismos más importantes por los cuales se promueve el crecimiento de las plantas (Martínez-Viveros *et al.*, 2010).

El ácido indol-3-acético (AIA)

Las bacterias producen pequeñas moléculas de señalización que están implicadas en el proceso de transducción de señales (Lavy & Estelle, 2016), su mecanismo de acción molecular subyacente facilita el cambio rápido entre la represión transcripcional y la activación génica a través de la degradación dependiente de auxinas de los represores transcripcionales (Martínez-Viveros *et al.*, 2010) el cual se inicia a partir de un estímulo ambiental o celular, y a partir de esta información reaccionan rápidamente transmitiendo dichas señales a la maquinaria transcripcional (Aguilar-Piedras et al., 2008). Las

interacciones entre las bacterias productoras de AIA y las plantas conducen a diversos resultados, que van desde la patogénesis hasta la fitoestimulación debido a que esta fitohormona está involucrada en múltiples procesos, incluida la división celular, la diferenciación y la formación de haces vasculares. La revisión del papel del AIA bacteriano en diferentes interacciones entre microorganismos y plantas destaca el hecho de que las bacterias utilizan esta fitohormona para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización, incluida la fitoestimulación y la elusión de los mecanismos de defensa basales de las plantas (Figura 1) (Vega-Celedón et al., 2016).

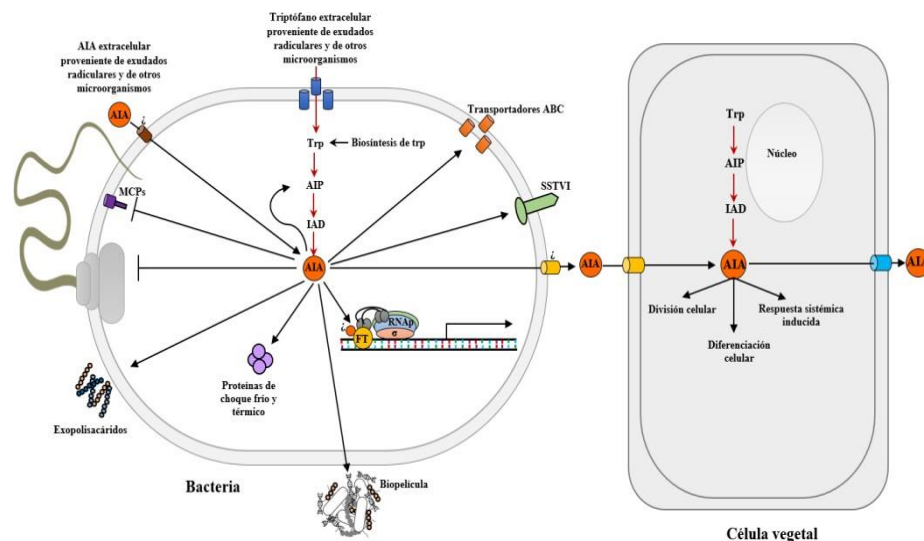


Figura 1. Modelo propuesto de la señalización mediada por Acido indol acético (AIA) en la asociación de un microorganismo con una planta. En la Bacteria el AIA participa en procesos relacionados con la formación de biopelícula y exopolisacáridos y en la célula vegetal en la división, diferenciación celular y la respuesta sistémica inducida. (Imagen obtenida de tesis de (Jiñón Moreno.2017)

Producción del ácido-3-indol acético por *Azospirillum*.

El mecanismo principal por el cual *Azospirillum* mejora el crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas como las auxinas, citocininas, giberelinas, entre otros y estas sustancias se liberan al medio y entran en contacto con la planta, y así se estimula el

crecimiento de la planta (Lucke et al., 2020). Dentro del grupo de las auxinas, el ácido-3-indol acético (AIA) es considerado como la principal fitohormona por los beneficios que le confiere. El AIA es generado también por la planta en cantidades nanomolares, en donde participa por ejemplo, en la expresión de genes que participan en división y diferenciación celular (Ucea-Herrera et al., 2020) (Donati2013). En *Azospirillum*, el AIA es un metabolito derivado del triptófano, y aunque puede ser tomado directamente de la planta, se conoce que la mayor fuente de AIA es a través de su biosíntesis por distintas vías (Figura 2) las cuales están nombradas según su precursor: 1) indol-3-acetonitrilo (IAN), 2) indol-3-acetamida (IAM), 3) ácido indol-3-pirúvico (IPyA), 4) Triptamina (TAM). Así mismo, se propone una vía alterna: 5) vía independiente de *trp* (Kravchenko et al., 2004, Aguilar-Piedras et al., 2008).

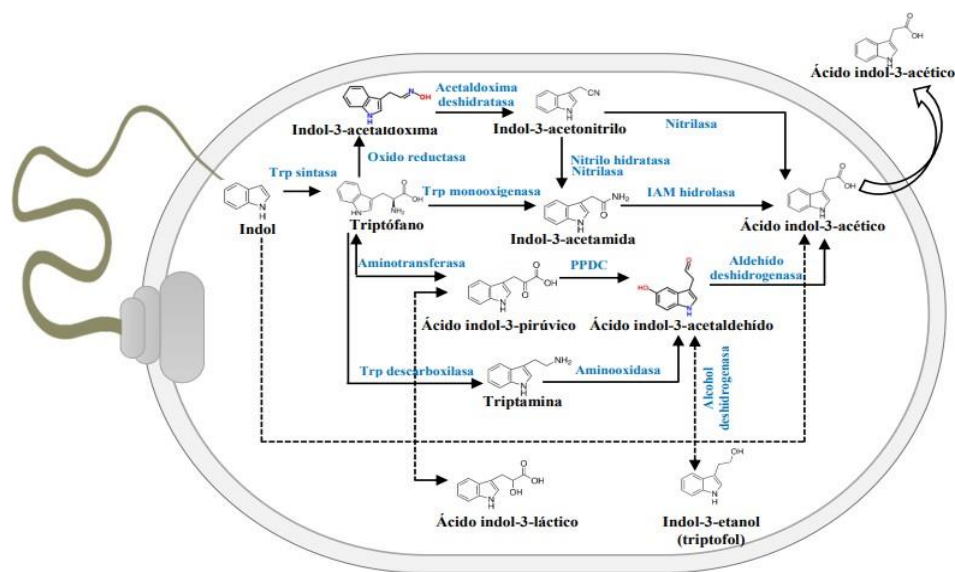


Figura 2. Rutas de biosíntesis de Ácido indol acético (AIA) en bacterias. (Imagen con modificaciones de (Jijón-moreno, 2017) (Abreviaturas: PPDC, Indol piruvato descarboxilasa).

Regulación del gen *ipdC* en bacterias

En la bacteria *Enterobacter cloacae* UW5, la expresión del gen *ipdC* es regulada de manera positiva y directa por el factor de transcripción TyrR el cual también controla la expresión de genes implicados en la captación y el metabolismo de los aminoácidos aromáticos (Coulson & Patten, 2015). Esta regulación se da a través de interacciones con dos cajas de TyrR ubicadas dentro de la región intergénica *akr-ipdC*. Por otro lado, en bacterias del género *Pseudomonas*, la regulación del gen *ipdC* es a través del factor sigma alternativo RpoS (σ^{38}).

Regulación transcripcional del gen *ipdC* en *Azospirillum brasilense*

En *Azospirillum* la vía del ácido indol-3-pirúvico, es considerada la vía principal de biosíntesis de AIA. En esta vía, el gen *ipdC* codifica para la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (PPDC), cuya eliminación produce un decaimiento de hasta el 90% de la biosíntesis de AIA (Figura 2) (Vega-Celedón et al., 2016). Análisis *in silico* realizados en *A. brasilense* Sp7 mostraron que el gen *ipdC*, se encuentra flanqueado por el gen *gltX* que codifica para un glutamato tRNA ligasa y por un gen que codifica para una proteína hipotética (Jijón Moreno, 2017). La región promotora del gen *ipdC* posee varios elementos en cis, que podrían intervenir en la regulación del gen. Los elementos que fueron identificados son: un sitio de unión a ribosoma (GGAGA), un sitio de unión putativo para el factor sigma 54 (también conocido como RpoN o σ^{54}) (Ucea-Herrera et al., 2020), un “elemento de respuesta a auxinas” (AuxRE (Vande Broek *et al.*, 2005) una repetición invertida perfecta de 8 pb, separada por un espaciador de 4 pb (ATTGTTTC(GAAT) GAAACAAT) (Figura 3).

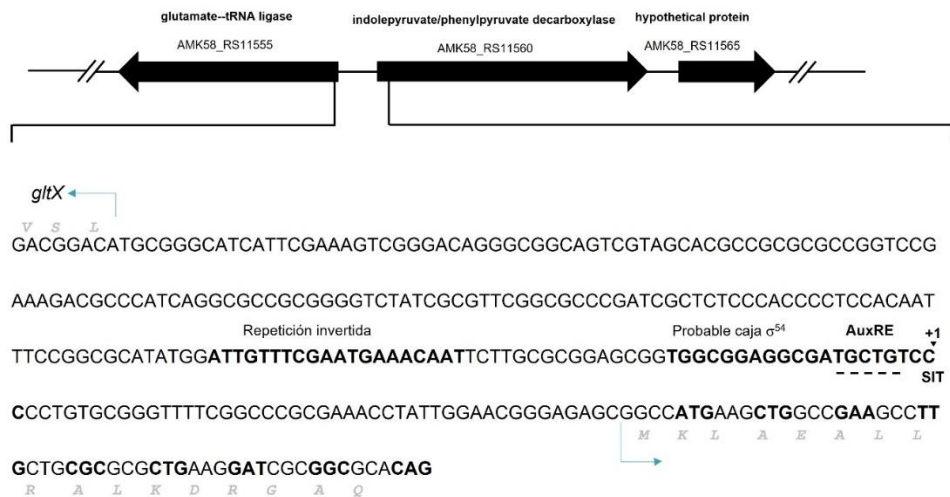


Figura 3. Región promotora del gen *ipdC*. Región 5' rio arriba de *ipdC* en *A. brasilense* Sp245 de (Jijón-moreno, 2017).

ANTECEDENTES DIRECTOS

El laboratorio de interacción bacteria planta tiene como objetivo identificar y caracterizar mecanismos moleculares implicados en interacción de la bacteria con la planta, para ello investiga como modelo experimental a la bacteria *Azospirillum brasilense* sola o asociada a plantas gramíneas. Una de las líneas de investigación del laboratorio consiste en identificar los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen *ipdC*, Jijón Moreno realizó una cromatografía de afinidad para aislar proteínas que interactuaran con el promotor del gen *ipdC*. Los resultados mostraron cuatro proteínas con un tamaño aproximado de: 155.3, 75.8, 23.5 y 18.2 KDa, las cuales fueron identificadas a través de MALDI-TOF (Figura 4). De esta manera fueron identificadas como la subunidad β de la RNA polimerasa, una poliribonucleótido nucleotidiltransferasa y dos reguladores transcripcionales; uno de la familia LuxR y otro de la familia MarR. Éstas últimas fueron nombradas como LibR por sus siglas en inglés de LuxR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator y MibR por MarR-like indole-3-acetic acid biosynthesis regulator (Jijón Moreno, 2017). Ambas proteínas fueron agrupadas en estas familias de reguladores transcripcionales gracias a la presencia de

dominios característicos de miembros de cada familia (Grove, 2013 y (Chen & Xie, 2011).

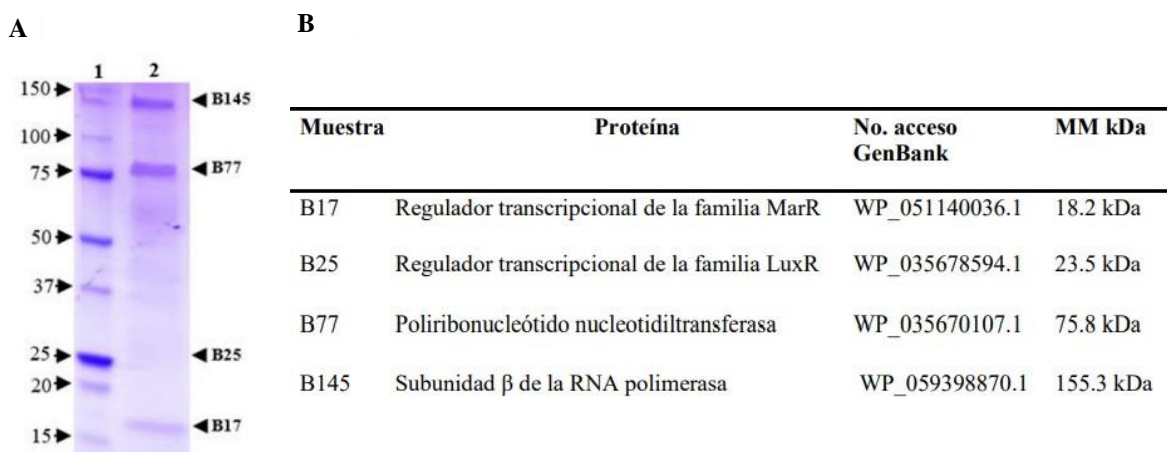


Figura 4. Identificación de proteínas en unión a la región promotora del gen *ipdC*. A) Separación desnaturalizante de proteínas por SDS-PAGE de proteínas previamente obtenidas por cromatografía de afinidad teñidas con Azul de Coomassie. B) Análisis de tipo MALDI-TOF aplicado a las proteínas observadas en SDS-PAGE y purificadas de la cromatografía de afinidad indicada en la figura 3A (Jijón Moreno, 2017).

LibR: Un regulador transcripcional de la familia LuxR

La proteína LibR está formada por 214 aminoácidos. Consta en su extremo N-terminal de un dominio REC (1-115aa) y en el extremo C-terminal contiene un dominio de unión al ADN del tipo HTH (151-208) (Figura 5). En el dominio REC se encuentra un residuo conservado de ácido aspártico (D54) en el cual podría llevarse a cabo una fosforilación permitiendo la activación de esta proteína.

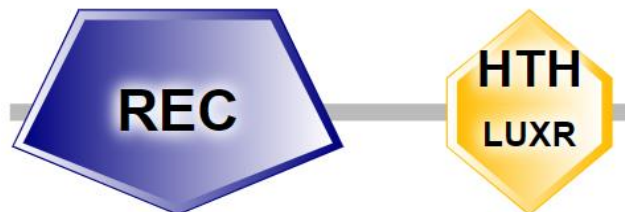


Figura 5. Dominios identificados en la secuencia de la proteína LibR, mediante el análisis en la plataforma SMART protein. Mediante un análisis *in silico*, se obtuvieron los dominios presentes en la proteína LibR que consta de un dominio REC en su extremo N-terminal y un dominio HTH en el extremo C-terminal.

La presencia de estos dominios clasifica a la proteína LibR como un miembro de la familia

de reguladores transcripcionales del tipo LuxR, los miembros de esta familia fueron descritos por primera vez en *Vibrio fischeri*. El regulador transcripcional LuxR es un factor clave en Quorum Sensing (QS), coordina la expresión de una variedad de genes, incluidos los que codifican factores de virulencia y biosíntesis de antibióticos, motilidad, nodulación, transferencia de plásmidos, bioluminiscencia y formación de biopelículas (Chen & Xie, 2011, Miller & Bassler, 2001, Tsai & Winans, 2010). Estas proteínas se encuentran en diversos organismos, y en gran parte de bacterias Gram (-) (Yáñez Meza, 2022). Según sus mecanismos de regulación, los reguladores de la familia LuxR se pueden dividir en diferentes grupos como se muestra en la Tabla 1 (Liu et al., 2020).

Tabla 1. Clasificación de proteínas de la familia LuxR según sus mecanismos de regulación. Se muestra un ejemplo de alguno de los miembros de cada grupo que ya han sido estudiados por diferentes grupos de trabajo.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Mecanismo de acción	Pertenecen a sistemas de doble componente (Sistemas de transducción de señales que conduce a la activación por fosforilación).	Contienen un dominio efector autónomo sin dominio de regulación	Tienen un sitio de unión a múltiples ligandos	Reguladores activados o reprimidos al unirse a N-acil homoserina lactonas (AHL), que se utilizan como moléculas QS en una variedad de bacterias Gram negativas.
Ejemplo (homólogos presentes en otros microorganismos)	FixJ (Rizobiaceae) NarL (<i>E. coli</i>)	GerE (<i>B. subtilis</i>)	MalT (<i>E. coli</i>)	TraR (<i>A. tumefaciens</i>) LuxR (<i>V. fisheri</i>)

Debido a los dominios presentes en la proteína LibR, se sugiere que ésta podría formar parte del grupo I, ya que contiene un residuo de ácido aspártico conservado en la posición 54 y que se ha evidenciado a través de alineamiento de secuencias de aminoácidos con proteínas de este mismo grupo (referencia).

LuxR en *Azospirillum*

Azospirillum brasilense es una importante bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB) que requiere varios pasos críticos para la colonización de las raíces, incluida la síntesis de biopelículas y exopolisacáridos (EPS) y la motilidad celular. En varias bacterias,

estos mecanismos están mediados por sistemas de detección de quórum (QS) que regulan la expresión de genes específicos a través de la unión a autoinductores denominados N-acil-homoserina lactonas (AHL) (Fukami et al., 2018). El quorum sensing mediado por AHL es estudiado intensamente en bacterias gram negativas en donde se constituye por una sintetasa autoinductora que es responsable de sintetizar AHL's (LuxI sintetisas) y un receptor del autoinductor (LuxR) que se convierte en un activador transcripcional (Vadakkan et al., 2018). El autoinductor es percibido por los receptores citoplasmáticos. La unión de AHL a LuxR inicia la homodimerización de estos complejos seguido de su asociación al promotor QS específico y la subsecuente transcripción de los genes relacionado al QS (Praneenararat et al., 2012, Koch *et al.*, 2005, Bez et al., 2021). Algunas bacterias presentan sistemas de QS no canónicos en donde los reguladores de respuesta LuxR han perdido su sintetasa de inductor. Estos sistemas son llamados LuxR *solos* o LuxR huérfanos, de tal manera que responden a otras moléculas señal (Gualpa et al., 2019). Estos datos son interesantes, ya que existen varios estudios en donde se muestra que diversas bacterias promotoras del crecimiento vegetal contienen en su mayoría LuxR *solos* (Hudaiberdiev et al., 2015).

López-Arteaga realizó una búsqueda de homólogos de la proteína LibR en el genoma de *Azospirillum brasilense* Sp7, donde encontró 15 proteínas que compartían los mismos dominios. En este mismo estudio, analizó el contexto genético de dichas proteínas, cuyos resultados permitieron identificar que se tratan de luxR *solos*, es decir que carecen de la sintetasa del inductor. En este sentido, sería importante evaluar el mecanismo de activación de las proteínas de la familia LuxR presentes en *A. brasilense* Sp7. Si bien, son pocos los estudios sobre proteínas LuxR, en el género *Azospirillum* se encuentran caracterizadas al menos las siguientes proteínas:

FlcA

FlcA es un regulador de respuesta que controla la floculación y la transformación morfológica de las células de *Azospirillum* de formas vegetativas a formas similares a quistes. La proteína FlcA, está constituida por 215 aminoácidos, pertenece a la familia LuxR de reguladores transcripcionales. Este homólogo de LibR presenta un dominio HTH de unión al ADN y tiene conservados residuos de Aspartato (Hou et al., 2014) los cuales podrían ser el

sitio de fosforilación de acuerdo a la comparación con otros reguladores transcripcionales caracterizados como StyR de *P. fluorescens* (Milani et al., 2005) e igualmente en FlcA de *A. brasilense* Sp7 (Jijón Moreno, 2017).

EraR

EraR es un regulador de respuesta identificado en *A. brasilense* Sp7. Esta proteína de tipo LuxR regula la expresión del gen *exaA* que codifica para una quinoproteína de alcohol deshidrogenasa quien juega un papel importante en el catabolismo de los alcoholes en bacterias, a través de un sistema de dos componentes que consta de EraS y EraR. La característica única de esta regulación es que EraR es un regulador de transcripción de tipo LuxR que interactúa con σ^{54} , sin embargo, carece del motivo GAFTGA, característico de las proteínas de unión potenciadoras (EBP) que interactúan con σ^{54} en otras bacterias. Además de esto se observó que se une a secuencias palindrómicas río arriba del gen *exaA* (Singh et al., 2017).

MibR: Un regulador transcripcional de la familia MarR

La proteína MibR está formada por 164 aminoácidos. Consta de un dominio de unión al ADN del tipo HTH (50-150) (Figura 6) (Jijón Moreno, 2017). La presencia de estos dominios clasifica a la proteína MibR como un miembro de la familia de reguladores transcripcionales del tipo MarR (Grove, 2013). Los miembros de la familia de reguladores transcripcionales del tipo MarR pueden ser clasificados de acuerdo a su rol fisiológico como reguladores de virulencia, reguladores de la respuesta a estrés del ambiente y reguladores de catabolismo aromático (Wilkinson & Grove, 2006). Las proteínas MarR constituyen una familia de reguladores transcripcionales de resistencia múltiple a antibióticos y reciben el nombre de *Escherichia coli* en donde fue caracterizada por primera vez la proteína MarR. Son miembros de la familia de factores de transcripción hélice-giro-hélice alada (wHTH) y se encuentran distribuidos en bacterias y arqueas (Grove, 2013). Mientras que algunos homólogos de MarR activan la transcripción, la mayoría reprime la actividad génica, ya que los homólogos de MarR son proteínas de unión al ADN que existen como dímeros y se unen a secuencias palindrómicas dentro de promotores afines (Jair et al., 1995). Cuando se une un ligando a la

proteína del tipo MarR, la unión al ADN se atenúa, lo que da como resultado una expresión génica activada. Este mecanismo general también da como resultado que la expresión de las proteínas MarR sea autorreguladora; a medida que aumenta la concentración celular de la proteína MarR, la autorregulación negativa detiene la transcripción adicional y evita la acumulación excesiva de proteínas (Grove, 2013).



Figura 6. Dominios identificados en la secuencia de la proteína MibR. Mediante un análisis en la plataforma SMART protein se obtuvieron los dominios presentes en la proteína de interés, el regulador transcripcional MibR el cual consta de un dominio HTH de 100 aminoácidos de longitud (50-150).

Si bien han sido identificados diversos miembros de la familia MarR en distintas bacterias, a la fecha no han sido identificados y/o caracterizados miembros de la familia MarR en *Azospirillum*.

Mutantes de los genes *libR* y *mibR*

Para ampliar la información sobre la posible participación de estas proteínas en la regulación de la expresión del gen *ipdC* así como en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* Sp7, Jijón en 2017, obtuvo mutantes de los genes LibR y MibR, presentes en el plásmido 1 y cromosoma respectivamente, así como una doble mutante en ambos genes. En el caso de la mutante LibR (nombrada 2113) se hizo eliminando 202 aminoácidos de la secuencia codificante de los 214 aminoácidos, mientras que en el caso de la mutante MibR (nombrada 2114) se generó eliminando 148 aminoácidos de la secuencia codificante de los 164 aminoácidos totales de la proteína. En ambas mutaciones se insertó un cassette de Km. En el caso de la mutante doble (nombrada 2115) se realizó eliminando el gen de resistencia a Km del plásmido pJMS- Δ libR::Km^R mediante restricción con XbaI y en su lugar se insertó un gen de resistencia a Gm obtenido del plásmido pBSL142, resultando el plásmido pJMS- Δ mibR::Gm^R. Estas tres

mutantes ($\Delta libR::Km^R$, $\Delta mibR::Km^R$ y $\Delta libR::Km^R \Delta mibR::Gm^R$) se evaluaron en ensayos de cuantificación de AIA, en los cuales se observó que la cepa mutante de LibR produjo 35% menos AIA que la cepa silvestre, mientras que la cepa mutante de MibR produjo niveles similares de AIA que la cepa silvestre. Sin embargo, cuando se analizó la doble mutante de LibR-MibR, la biosíntesis de AIA se redujo en 51% (Figura 7) (Jijón Moreno, 2017), estos resultados sugieren la participación de ambas proteínas en la regulación del gen *ipdC*. Posteriormente, se evaluó la expresión del gen *ipdC* con las tres mutantes. Los resultados mostraron una disminución en la expresión del gen de la indol piruvato descarboxilasa (Figura 8). La mayor disminución se observó en la doble mutante, lo que apoya la idea de la participación de ambas proteínas en la regulación del gen. En ambos casos, es decir; en los ensayos de cuantificación de AIA y en los análisis de la expresión del gen *ipdC*, la disminución fue mucho más significativa en la doble mutante, lo que sugiere la participación en conjunto de estas proteínas en la regulación de dicho gen (Jijón Moreno, 2017). A la fecha, se desconoce si las proteínas MibR y LibR podrían interactuar entre ellas y así poder potenciar su efecto como posibles reguladores transcripcionales. Debido a la existencia de una repetición invertida presente en la región intergénica del gen *ipdC* se sugiere la participación de estas proteínas en la regulación del gen, aunque aún no existe evidencia de que sea esta la región identificada por las proteínas de interés para llevar a cabo su función.

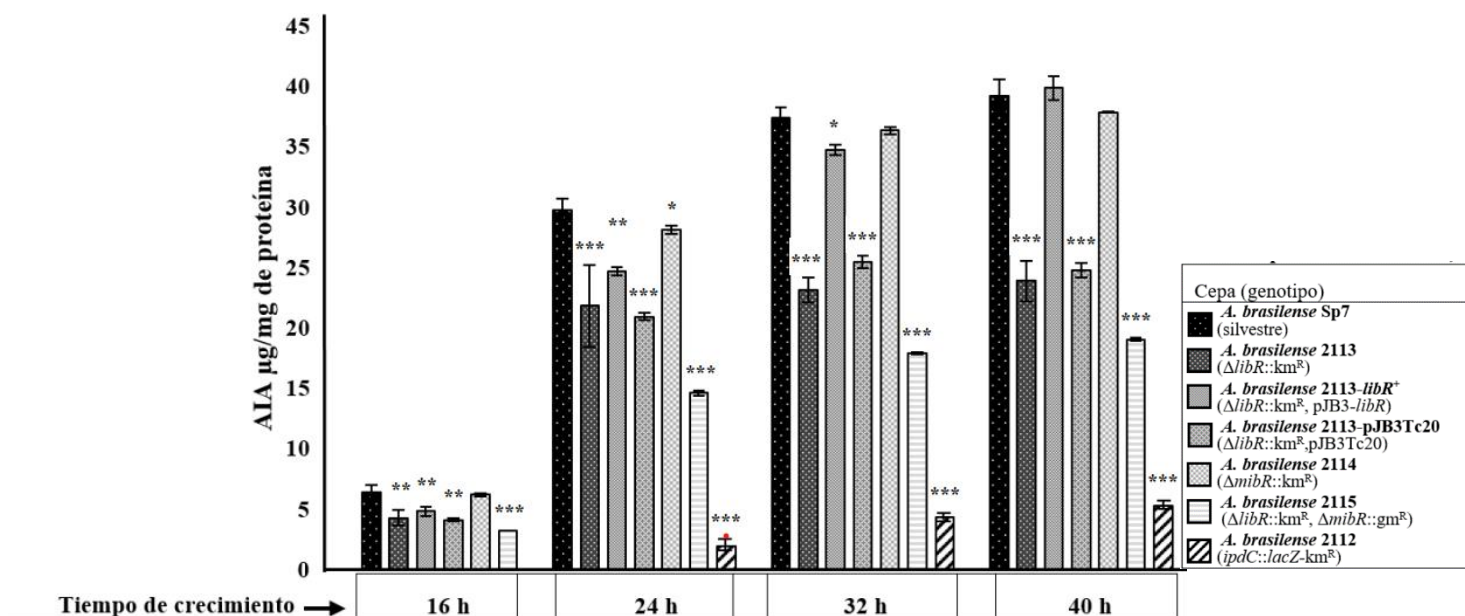


Figura 7. Producción de AIA por cepas de *A. brasilense* Sp7 y cepas mutantes. La cuantificación de AIA respecto al tiempo se hizo mediante HPLC. (Imagen obtenida de tesis de Jijón Moreno)

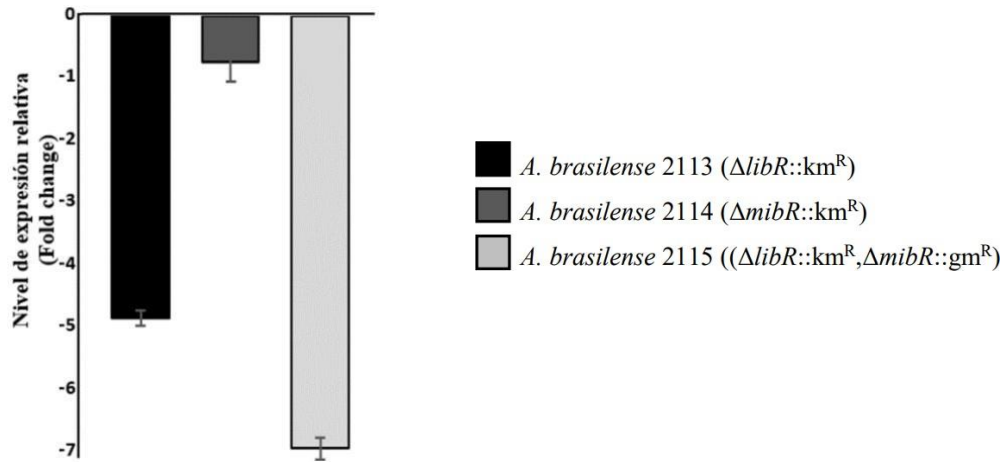
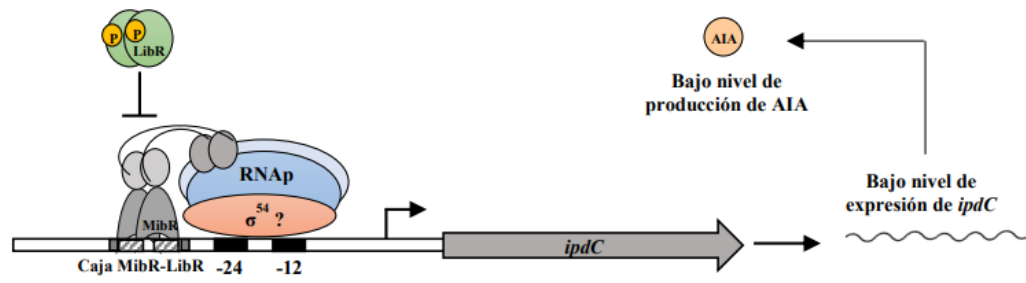
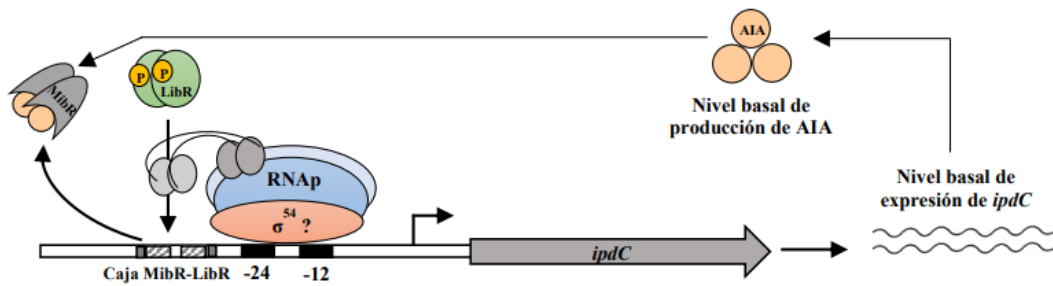


Figura 8. Análisis de la expresión del gen *ipdC* en cepas de *A. brasilense*. La expresión del gen se realizó mediante ensayos de RT-PCR, tomando como referencia la expresión del gen constitutivo *gyrA* Imagen obtenida de tesis de (Jijón Moreno 2017).

Jijón Moreno se propuso un modelo hipotético para describirla regulación mediada por las proteínas MibR y LibR; en el cual se sugiere que, durante la fase exponencial de crecimiento de *A. brasilense* Sp7, MibR se une al promotor en ausencia de AIA activando en bajos niveles la expresión del gen *ipdC*. Al comenzar la síntesis de AIA en esta fase, el aumento en la concentración de este metabolito permite su unión a MibR, lo que deriva en un cambio conformacional que hace a este regulador disociarse de la región promotora, permitiendo así la unión de LibR en su estado fosforilado, logrando que este interactúe físicamente con el factor $\sigma 54$ activando la expresión de *ipdC* a una mayor tasa cuando la densidad celular alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Figura 9).



b. Fase exponencial tardía de crecimiento



c. Fase estacionaria de crecimiento

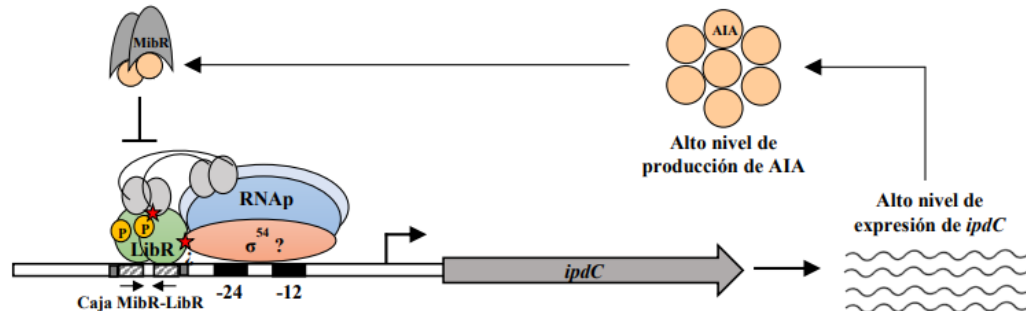


Figura 9. Modelo propuesto de la regulación transcripcional de *ipdC* en *A. brasilense* Sp7. En la fase estacionaria de crecimiento, la alta concentración de AIA mantiene a MibR en su estado inactivo permitiendo la unión de LibR fosforilado al promotor (mostrado con un círculo amarillo) el cual posiblemente interactúa físicamente con la RNA polimerasa y con el factor σ^{54} (mostrado con estrellas de color rojo) para activar la expresión de *ipdC* a una mayor tasa de expresión (Jijón Moreno 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En trabajos previos del laboratorio interacción bacteria-planta fueron identificadas dos proteínas que se unen a la región intergénica del gen *ipdC*, denominadas MibR y LibR por su participación en la biosíntesis del ácido indól acético (AIA). Debido a los dominios presentes en cada una de ellas las clasificaron como miembros de la familia de reguladores transcripcionales MarR y LuxR, respectivamente. Los análisis realizados con mutantes por delección de estas proteínas mostraron una disminución en la expresión del gen *ipdC* y en la biosíntesis del AIA. En ambos casos, la disminución fue mucho más significativa en la doble mutante, lo que sugiere una participación conjunta de estas proteínas en la regulación del gen, sin embargo, se desconoce si las proteínas MibR y LibR podrían interactuar entre ellas para así potenciar su efecto como posibles reguladores transcripcionales, ya que la repetición invertida presente en la región intergénica del gen *ipdC* sugiere la participación de estas proteínas en la regulación del gen, aunado a ello, no existe evidencia de que sea esta la región identificada por las proteínas de interés para llevar a cabo su función. Debido a la relevante participación del gen *ipdC* en la biosíntesis de AIA, el carecer de información respecto a su regulación transcripcional, limita la oportunidad de proponer mecanismos que permitan incrementar la producción de una de las fitohormonas más importantes en la interacción de la bacteria con la planta.

JUSTIFICACIÓN

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente, hoy la agricultura tiene la necesidad de utilizar a los microorganismos como biofertilizantes. *Azospirillum*, es considerada una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal ya que provee beneficios en la salud y crecimiento de la planta a través de mecanismos directos e indirectos, como la fijación de nitrógeno y la producción de fitohormonas. El Acido Indol Acético (AIA) es la principal fitohormona sintetizada por las PGPR principalmente por la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA) y de la cual la Indol Piruvato descarboxilasa codificada por el gen *ipdC*, es la responsable de la mayoría de la biosíntesis de AIA. Se conocen diversos factores ambientales que regulan la expresión del gen *ipdC*, sin embargo, se conoce muy poco sobre los procesos moleculares que rigen su expresión. El estudio de la posible interacción entre MibR y LibR aportaría información respecto al mecanismo por el cual, en la cepa carente de ambas proteínas, existe una disminución marcada en la producción de AIA y en la expresión del gen. La visión a largo plazo permitirá explotarlos en múltiples formas: mediante el desarrollo de biotecnologías agrícolas que favorezcan la producción vegetal en un contexto de sostenibilidad y respecto al medio ambiente.

HIPÓTESIS

Los reguladores transcripcionales LibR y MibR interactúan entre sí para regular la expresión del gen *ipdC* y con ello, la biosíntesis de AIA.

OBJETIVOS

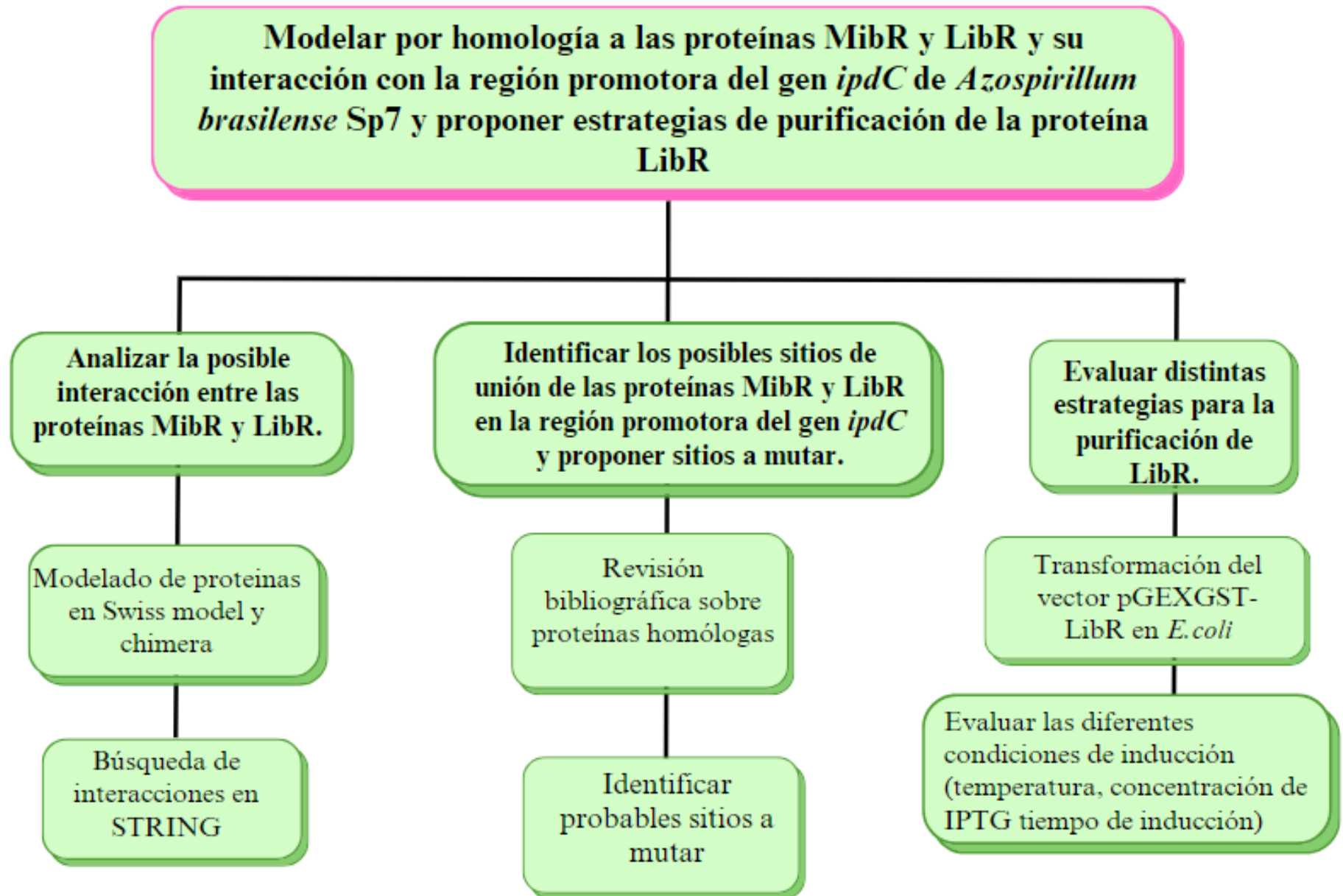
Objetivo general

Modelar por homología a las proteínas MibR y LibR y su interacción con la región promotora del gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y proponer estrategias de purificación de la proteína LibR

Objetivos Específicos

- Analizar la posible interacción entre las proteínas MibR y LibR.
- Identificar los posibles sitios de unión de las proteínas MibR y LibR en la región promotora del gen *ipdC* y proponer sitios a mutar.
- Evaluar distintas estrategias para la purificación de LibR.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico empleado

Tabla 2. Material biológico empleado

Cepas		
Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> Rosetta pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Sigma Aldrich
Plásmidos		
PGEX-4T1	Plásmido de expresión de proteínas. Ap ^R	(GE Healthcare Life Sciences)
pGEXGST-libR	Plásmido de expresión que contiene el gen <i>libR</i> fusionado al gen <i>gst</i> . Este plásmido fue utilizado para la expresión de LibR en <i>E. coli</i> BL21. Ap ^R y y en <i>E. coli</i> Rosetta pLysS Ap ^R	(Jijón Moreno, 2017) Este trabajo
pGEXGST-mibR	Plásmido de expresión que contiene el gen <i>mibR</i> fusionado al gen <i>gst</i> . Este plásmido fue utilizado para la expresión de MibR en <i>E. coli</i> BL21. Ap ^R y en <i>E. coli</i> Rosetta pLysS Ap ^R	(Jijón Moreno, 2017) Este trabajo

Análisis Bioinformáticos

Las secuencias de las proteínas de interés MibR (AMK58_RS00175) y LibR (AMK58_RS19435), así como la secuencia de la región intergénica del gen *ipdC* que codifica para la enzima fenilpiruvato descarboxilasa (AMK58_RS11560) se obtuvieron de la base de datos del NCBI, además de emplear herramientas bioinformáticas como la plataforma String, prosite, UnitPro, entre otras.

Con esta información básica recabada se procedió a realizar el modelado de proteínas con ayuda de la plataforma SWISS MODEL y exportando el resultado al programa CHIMERA, de igual forma con el mismo fin de buscar interacciones entre heterodímeros de estas proteínas se procedió a utilizar una plataforma de interacciones de proteínas llamada STRING.

CLUSTAL OMEGA

Clustal Omega es un programa de alineación de secuencias múltiples que genera alineaciones entre tres o más secuencias conjuntas obteniendo resultados eficientes y precisos. El “Clustal Consensus” (última línea del alineamiento), incluye alguno de los siguientes caracteres: a) Asterisco (*); indica que en dicha posición los residuos son 100% idénticos, b) dos puntos (:); indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas y c) punto (.); indica sustituciones menos conservativas.

MULTIPLE ALING SHOW

Esta plataforma utiliza alineamientos múltiples obtenidos en otros programas, con el objetivo de resaltar la conservación y/o similitud de residuos lo cual permite establecer el porcentaje de identidad que se busca y asignar un color determinado para su identificación.

PDB (PROTEIN DATA BASE)

El archivo PDB es un depósito de coordenadas atómicas y otra información que describe proteínas y otras macromoléculas biológicas importantes, los biólogos estructurales utilizan métodos como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de RMN y la microscopía crioelectrónica para determinar la ubicación de cada átomo en relación con los demás en la molécula. Luego depositan esta información, que luego es anotada y publicada públicamente en el archivo.

SWISS-MODEL

Esta plataforma se utilizó para iniciar el modelado por homología de los homodímeros de MibR y LibR ya que SWISS-MODEL es una plataforma que predice la estructura de una secuencia de aminoácidos mediante el análisis de la calidad de la estructura generada basándose en proteínas con una identidad parecida prediciendo la probable función que posee la proteína de interés, utilizando diferentes herramientas estadísticas para evaluación del modelado descritas en la plataforma.

La construcción de un modelo de homología comprende cuatro pasos principales:

- Identificación de plantillas estructurales
- Alineación de la secuencia objetivo y estructura (s) de plantillas
- Construcción de modelos
- Evaluación de la calidad del modelo

Estimar la calidad de los modelos de estructura de proteínas es un paso sumamente importante debido a que en esta plataforma se tienen un conjunto de modelos alternativos donde usualmente se tiene que seleccionar el mejor candidato y para eso se tienen tres aspectos a calificar:

QMEANDisCo es una puntuación global de la calidad absoluta tanto globales (es decir, para toda la estructura) como locales (es decir, por residuo) sobre la base de un solo modelo,

depende en gran medida del tamaño del modelo, la estimación del error proporcionada se calcula en función de modelos de tamaño similar a la entrada (*Help / SWISS-MODEL*, s. f.).

QMEAN es una evaluación global y puntual, donde se califica originalmente en un rango [0,1] y donde uno es la mejor puntuación (*Help / SWISS-MODEL*, s. f.).

Ramachandran favorecido Los gráficos de Ramachandran sirven como herramienta de verificación indirecta de la estereoquímica y la geometría del complejo al establecer que ninguna de las geometrías se encuentra en las regiones prohibidas electrostáticamente desfavorables del gráfico (*Ramachandran Plot - an overview / ScienceDirect Topics*, s. f.)

UCSF CHIMERA

Es un sistema de análisis y visualización molecular altamente extensible e interactivo, CHIMERA puede leer estructuras moleculares y datos asociados en una gran cantidad de formatos, mostrar las estructuras en una variedad de representaciones y generar imágenes y animaciones de alta calidad adecuadas para su publicación y presentación. A partir de estas herramientas que nos proporcionó el programa, se logró obtener los modelados de las proteínas por homología como homodímeros y monómeros y así poder editar el modelado a modo de resaltar áreas relevantes de cada modelo de las proteínas LibR y MibR, así como se intentó diseñar un heterodímero de los monómeros de las proteínas en cuestión, para determinar si alguna de sus áreas “linker” eran compatibles con la otra.

STRING

La base de datos STRING contiene información de numerosas plataformas bioinformáticas incluyendo: datos experimentales, métodos de predicción computacional y colecciones de textos públicos, esta herramienta de búsqueda se utiliza para la recuperación de genes/proteínas que interactúan) es una base de datos biológica y un recurso web de interacciones proteína-proteína conocidas y previstas. Los resultados obtenidos en esta

plataforma muestran lo siguiente y debe ser considerado para su interpretación:

NODOS

Rojo: Proteínas de consulta y primera capa de interactores.

Blancos u otros colores: Segunda capa de interactores

LINEAS

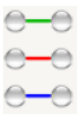
Los bordes (círculos blancos) representan asociaciones proteína-proteína las asociaciones (líneas) están destinadas a ser específicas y significativas, es decir, las proteínas contribuyen conjuntamente a una función compartida; esto no significa necesariamente que estén físicamente vinculados entre sí.

Interacciones conocidas



de bases de datos seleccionadas
determinado experimentalmente

Interacciones previstas



vecindario de genes
fusiones de genes
co-ocurrencia de genes

Otros



extracción de textos
coexpresión
homología de proteínas

Análisis Experimentales

Medios de cultivo

El medio de Luria Bertani (Bertani, 1952) líquido o adicionado con agar se utilizó para el crecimiento de todos los cultivos bacterianos y para los ensayos de expresión. Su composición química es la siguiente: 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y 10 g/L de peptona de caseína. Cuando fue requerido se adicionaron los siguientes antibióticos: (Ampicilina (50 ug/ml) y cloranfenicol (34ug/ml).

Características de las fusiones traduccionales de las proteínas MibR y LibR

La construcción pGEXGST-mibR está constituida por la secuencia codificante de MibR (495 pb) en el vector de expresión pGEXGST (5460pb), de tal manera que se obtiene la proteína de fusión GST-MibR (GST fusionada al extremo N-terminal de MibR) con un peso aproximado de 43 KDa. Por otro lado, LibR (645 pb) quedó fusionada con GST en su N-terminal dando origen a una construcción que codifica para una proteína de aproximadamente 49 kDa. Estas construcciones están albergadas en *E.coli* BL21 para generar cultivos que permitan expresar e inducir a la proteína para su posterior purificación.

Expresión de las proteínas híbridas GST-MibR y GST-LibR en la cepa BL21.

Las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio Lb amp (50mg/ml) a 30°C overnight (precultivo) posteriormente, se tomó el volumen correspondiente a una dilución uno 1:100 a partir del precultivo y se colocó en matraces de 25 ml de medio Lb más ampicilina (50 mg/ml) hasta llegar a una DO₅₀₀ ≈0.5-0.6. Alcanzada la DO, el cultivo se indujo con 0.1 mM IPTG a 30°C durante 3 h. Las células del cultivo fueron colectadas mediante centrifugación y se lavaron con un ml de buffer de fosfatos PBS 1X (NaCl 137mM, 2.7 mM KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄) y se procedió a sonicar por pulsos mediante 3 series de 15 pulsaciones al 40% de potencia., posteriormente se separó pellet y sobrenadante y se tomó una muestra a la que se le agregó buffer de carga y se hirvieron por

5 min para su evaluación posterior con SDS-PAGE.

Evaluación de diferentes condiciones de inducción en *E. coli* BL21

Con el fin de obtener una mayor expresión de la proteína, debido a que al obtener el sobrenadante la proteína se quedaba en el pellet en cuerpos de inclusión, se evaluaron distintas condiciones de inducción como lo es: temperatura, tiempo de inducción, D.O, concentración de IPTG, cepa de expresión.

Evaluación de tiempos de inducción

Para llevar a cabo el procedimiento de inducción de proteína, se realizaron cultivos como se mencionó previamente hasta que se alcanzó una $DO_{500} \approx 0.5$. Al llegar a la D.O esperada los 25 ml de cultivo se separaron en tubos de 5 ml considerando uno de ellos como NI (No inducido) 0.5, 1, 2 y 3 horas de inducción, añadiendo IPTG 0.1 mM en todas las horas excepto en el no inducido. Al terminar el tiempo de incubación correspondiente se concentró el volumen total de cada tubo mediante centrifugación descartando el sobrenadante. Posteriormente se evaluó el resultado mediante SDS-PAGE.

Evaluación de temperatura

Para identificar la mejor temperatura en la inducción de proteína, se realizaron cultivos como se mencionó previamente hasta que se alcanzó una $DO_{500} \approx 0.5$. Al llegar a la D.O esperada los 25 ml de cultivo se separaron en tubos de 5 ml considerando uno de ellos como: NI (No inducido) 16°C, 30°C y 37 °C añadiendo inductor (IPTG) 0.1 mM en todas las temperaturas excepto en el no inducido. Al terminar el tiempo de inducción de 3 horas en la temperatura correspondiente, el volumen de cada tubo se concentró mediante centrifugación en tubos de 2 ml descartando el sobrenadante. Posteriormente se evaluó el resultado mediante SDS-PAGE.

Evaluación de concentración de inductor.

Para llevar a cabo la evaluación de la mejor concentración de IPTG en la inducción de proteína, se realizaron cultivos como se mencionó previamente hasta que se alcanzó una $DO_{500} \approx 0.5$. Al llegar a la D.O esperada los 25 ml de cultivo se separaron en tubos de 5 ml considerando uno de ellos como NI (No inducido), 0.05 mM y 0.025 mM de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) correspondiente a cada tubo excepto en el no inducido. Al terminar el tiempo de inducción de 3 horas a 30 °C, el volumen de cada tubo se concentró mediante centrifugación en tubos de 1.5 ml descartando el sobrenadante. Posteriormente, se evaluó el resultado mediante SDS-PAGE.

Evaluación de D.O (densidad óptica)

Para identificar la mayor inducción de proteína, se realizaron cultivos como se mencionó previamente, sin embargo, a partir de un precultivo, se colocó la relación 1/100 en diferentes tubos y no en un solo matrás. En los tubos se esperó a alcanzar una $OD_{500} \approx 0.5, 0.4$ y 0.3 . Al llegar a la D.O esperada se añadió IPTG 0.05 mM en todas las densidades excepto en el no inducido. Al terminar el tiempo de inducción de 3 horas a 30°C, se concentró el volumen total de cada tubo mediante centrifugación descartando el sobrenadante. Posteriormente se evaluó el resultado mediante SDS-PAGE.

Evaluación de la expresión en una cepa alternativa

La sobreexpresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* a menudo conduce a la acumulación intracelular de proteínas parcialmente plegadas en agregados llamados cuerpos de inclusión y debido a la poca cantidad en la expresión de la proteína libre en sobrenadante, se consideró un nuevo vehículo de expresión, y se optó por utilizar *E.coli* Rosetta pLysS, donada por el El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Verificación de la cepa donada de Cinvestav *E.coli* Rossetta pLysS

Se sembró una alícuota de *E. coli* Rosetta pLysS en tubos de 5 ml con medio LB con diferentes antibióticos (ampicilina, kanamicina, cloranfenicol), según el genotipo de *E. coli* Rosetta pLysS, esta tiene resistencia a cloranfenicol.

Células competentes

Las células de *E.coli* se crecieron en 50 ml de medio LB a 37°C hasta una OD₆₀₀≈0.6, se transfirieron a un tubo de centrifuga y se incubaron por 15 min en hielo. Las células se recuperaron por centrifugación a 3,000 rpm por 15 min a 4°C. Las células se incubaron nuevamente en hielo, se centrifugaron y se recuperaron en 2.6 mL de medio 2Xyt-CC. Se realizaron alícuotas para su almacenaje a -70°C o hasta su utilización.

Minipreparaciones

De acuerdo al método Minipreps of plasmid DNA (Engebrecht et al., 1998), las células de 3 ml de un precultivo de la cepa *E. coli* BL21 incubadas durante toda la noche se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µL de solución I (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Las células se incubaron con 200 µL de solución II (200 mM NaOH, SDS 1%) y con 150 µL de solución III (Acetato de potasio 3M pH 5.5). La mezcla se centrifugó para descartar los restos celulares. El sobrenadante se mezcló con 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó. El sobrenadante se mezcló con 500 µL de cloroformo y se separó por centrifugación. El ADN plasmídico recuperado en el sobrenadante se incubó con 500 µL de isopropanol a -20°C durante al menos 1 h, se centrifugó y se decantó. El pellet se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se centrifuga (se repite este paso volviendo a lavar y centrifugando), el ARN se eliminó con un tratamiento con 0.25 µg de ARNasa (Invitrogen) por 20 min a 25°C seguido de la inactivación de la enzima a 50°C por 2 min, al terminar se resuspendió en 30 µl de TE (10 mM Tris/HCL y 1 mM EDTA disódico, pH 8).

Transformación (Choque térmico)

Se agregó 5 μ l del producto de lisis (pGEXGST-libR) a 100 μ l de las células competentes de la cepa *E. coli* Rosseta pLysS y se colocaron 30 min en hielo y después se incubó a 42°C durante 1 min 50 s, y se pasó a un tubo de 1.5 ml, manteniéndose en hielo, se agregó un ml de medio LB sin antibiótico y se incubó una hora 30 min a 37°C con 150rpm. Se centrifugó a mil rpm durante 30 s y se desechó el medio LB retirándolo con una micropipeta dejando 100 μ l en el tubo para resuspender la pastilla, la cual se plaqueó en una placa con medio LB-Ampicilina 100 μ g/ml y se incubó durante 16 h a 37 °C.

Ensayos de expresión en *E. coli* Rosseta pLysS

Las clonas seleccionadas se cultivaron en tubos con 5 mL de medio LB+Amp (50 mg/ml) a 30°C overnight posteriormente se cultivaron 300 μ l del cultivo ya crecido en matraces con 25 ml de medio LB+Amp (50mg/ml) de igual forma a 30°C hasta una OD 300 \approx 0.3 Se tomó una muestra de 500 μ L y se concentró en un volumen final de 1 mL. El cultivo se indujo con 0.1 mM IPTG a 37°C durante 3 h. Las células colectadas de una fracción de 1.5 mL se resuspendieron en 300 μ L de buffer de lavado y se sonicaron durante 20 s (Fracción: Después de la inducción). Las fracciones colectadas se analizaron en geles de acrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los geles (separador y concentrador) se prepararon de acuerdo al protocolo de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1987), a una concentración de 10 y 4%, respectivamente. Ambos geles se realizaron a partir de Acrilamida/Bisacrilamida en una relación de 37.5:1, persulfato de amonio (APS) 10%, TEMED, SDS 10%, y buffer separador (Tris-HCl 1.5 M, ph 8.8) o buffer concentrador (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8).

A las muestras a evaluar, se les agregó buffer de carga 4X y se hirvieron por 5 minutos,

posteriormente, las muestras se cargaron en los pozos (25 ul) y el corrimiento se realizó a 60 volts hasta que la muestra entrara al gel separador y después se subió a 100 volts hasta que el frente de corrimiento estuviera en la parte inferior. La electroforesis se realizó en buffer de corrida (250mM de Trisma base, 2M Glicina, SDS al 1%). Los pellets de las muestras en las cuales se evaluaron las distintas condiciones de inducción, se le agrego 250 ul de PBS 1X con inhibidores de proteasas y se procedió a sonicar por pulsos, una vez traslucida la muestra, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min para separar el pellet y sobrenadante, posteriormente, se tomó un volumen para correrla en el SDS-PAGE, al cual se le colocó buffer de carga 4X y se hirvió durante 10 min a 95 °C. Posteriormente, la inducción de la proteína se evaluó a través de la tinción con Azul de Coomassie.

Tinción de geles de poliacrilamida (Coomassie)

Los geles de poliacrilamida se tiñeron en solución de tinte (Metanol 50%, Ácido acético 10%, Azul de coomassie R250 0.05%, agua 40%) durante 15 min aproximadamente y se destiñeron en solución de desteñido (metanol 50%, Ácido acético 2%) hasta que las bandas de proteínas fueran visibles

Western Blot

Las muestras fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 10 %. Posteriormente, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) con buffer Tris 25 mM pH 8.8, glicina 150 mM y metanol 20% (vol/vol). Estas membranas fueron bloqueadas con solución de bloqueo (5% leche en polvo, Tween-20 0.1%, PSB1X) durante toda la noche a 4°C, posteriormente, se continuó con la incubación del primer anticuerpo anti GST a una dilución de 1:3000 durante dos horas a temperatura ambiente, finalmente se incubó con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, durante una hora a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min con buffer de lavado (PSB1X Tween-20 0.1%). La reacción colorimétrica se obtuvo a través de la incubación de la membrana con diaminobencidina y agua oxigenada.

RESULTADOS

RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS

Modelado por homología

Proteína LibR

Se llevó a cabo el modelado por homología de la proteína LibR con el fin de conocerla más a fondo, por lo que se realizó el modelado del monómero en SWISS model donde se tomaron los moldes con mayor identidad, que en este caso fue DosR de *Mycobacterium tuberculosis* para el caso de la proteína LibR, el cual fue exportado al programa CHIMERA, obteniendo el monómero en el cual tenemos 10 alfa hélices y cuatro beta-plegadas. Debido a las dudas que surgieron acerca de cómo podía interactuar esta proteína LibR que es de la familia LuxR con las proteínas de la familia MarR que es MibR, se procedió a modelar nuevamente la proteína, pero ahora como un homodímero.

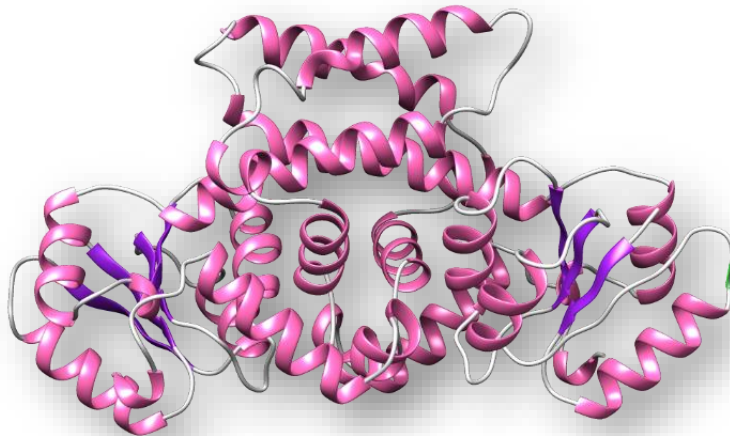


Figura 10. Modelado por homología de la proteína LibR (WP_035678594.1) de *A. brasilense Sp7*. LibR está constituida por 10 alfa-hélices (rosa) y 5 beta plegadas (morado) identificadas, Seq Identity 30.00%, Ramachandran Favoured 93.87%.

Proteína MibR

De igual forma para el caso de la proteína MibR se utilizó el programa SWISS model y la base de datos PDB para crear el modelado por homología de la proteína, partiendo de los moldes con mayor identidad, que en este caso fue de un regulador transcripcional de la familia MarR de *Rhodopseudomonas palustris* llamado CouR. Posteriormente, se modeló la proteína en el programa CHIMERA como homodímero donde en cuanto a la estructura se obtuvo que tiene 6 alfa hélices y 2 beta plegadas. En el modelado podemos observar el dominio característico de la familia MarR de hélice alada que se encuentra en el dominio HTH (Figura 11).

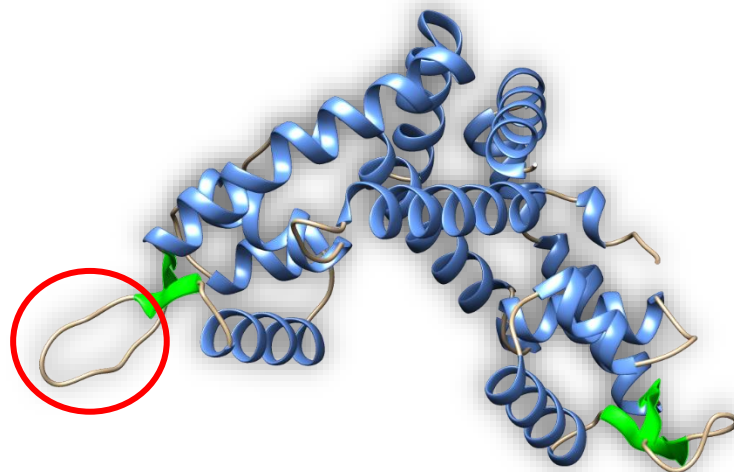


Figura 11. Modelado por homología de la proteína MibR (WP_035678594.1) de *A. brasilense* Sp7. MibR está constituida por seis alfa-hélices (azul) y 2 beta plegadas (verde). Encerrado en el círculo rojo el característico dominio wHTH. Seq Identity 37.68%, Ramachandran Favoured 95.59%.

Posible interacción *in silico* entre las proteínas MibR y LibR

Los modelados se realizaron con el fin de comprender de una mejor forma las características de ambas proteínas, en el caso de MibR que es de la familia MarR, éstas se caracterizan por no tener una identidad alta en su secuencia de aminoácidos con otros miembros de esta familia, no obstante, su estructura secundaria es idéntica. En el caso de esta proteína la

dimerización entre los dos monómeros está mediada por interacciones entrelazadas entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 6$ de cada monómero. En el caso de LibR la dimerización entre sus dos monómeros está mediada por interacciones entrelazadas entre las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ de cada monómero que corresponderían al área del linker y va de los aminoácidos 98 a 149 los cuales abarcan la parte intermedia entre los dominios N- y C-terminal que se unen con la otra subunidad del monómero. Tomando en cuenta la información recolectada en la bibliografía, no hay evidencia de una posible interacción o unión entre sus monómeros o dímeros, ya que los residuos de unión son muy específicos para cada familia y para cada proteína y puede variar mucho incluso entre proteínas de la misma familia, así que se procedió a explorar una posible interacción a través de una plataforma especializada en interacciones de proteínas.

Búsqueda bioinformática en la plataforma STRING

Con el objetivo de explorar *in silico* una posible formación de heterodímeros entre ambas proteínas (LibR y MibR) y con ello ahondar en la información que apoye los resultados obtenidos previamente sobre el efecto de las mutaciones de ambos genes en la biosíntesis de AIA, se usó de la plataforma STRING, partiendo de que en ésta se encuentran disponibles los siguientes genomas de *Azospirillum* sp.:

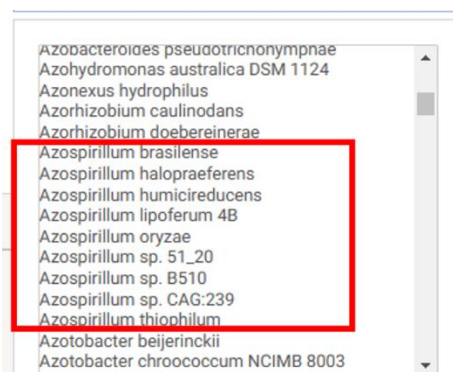


Figura 12. Genomas de *Azospirillum* ssp. cargados en la plataforma STRING recientemente. Se encuentran disponibles nueve genomas de *Azospirillum* ssp para identificar la posible interacción de ambas proteínas.

Análisis de la proteína LibR en la plataforma STRING

Se analizó la secuencia de aminoácidos perteneciente a la proteína LibR en la plataforma

STRING en el genoma de *Azospirillum brasilense*. Al ingresar los datos, la proteína con mayor identidad registrada es FlcA (Figura 13), la cual es un regulador transcripcional de la familia LuxR, que controla la floculación de las células y la colonización de la superficie de la raíz de la planta y con la cual tiene una identidad del 63%. Las siguientes 3 proteínas son proteínas homólogas que no están caracterizadas aún. Subsecuente a éstas, se encuentra NarL con una identidad del 34.2% respecto a su secuencia de aminoácidos, como se mencionó anteriormente, LibR posee una alta homología a nivel de estructura terciaria con NarL de *E. coli*. El regulador transcripcional NarL forma parte de un sistema de doble componente que controla la expresión de varios genes involucrados en la respiratoria anaeróbica en respuesta al nitrato (Cavicchioli et al, 1995). NarL es considerado un factor de transcripción global, que activa el inicio de la transcripción en muchos promotores diana (Ruanto et al., 2020).

protein	organism	annotation	identity	bitscore	e-value
<input checked="" type="checkbox"/> flcA	Azospirillum brasilense	Transcriptional regulator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	63.3%	253.4	9.4e-69
<input type="checkbox"/> AIB10938.1	Azospirillum brasilense	Transcriptional activator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	50.7%	203.8	8.5e-54
<input type="checkbox"/> AIB11746.1	Azospirillum brasilense	Transcriptional Regulator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	38.7%	141.7	4e-35
<input type="checkbox"/> AIB11841.1	Azospirillum brasilense	Putative transcriptional regulator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	37.5%	121.7	4.3e-29
<input type="checkbox"/> narL1	Azospirillum brasilense	Two-component transcriptional regulator (With NarX) of nitrate reductase; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	34.2%	99.4	2.3e-22
<input type="checkbox"/> narL2	Azospirillum brasilense	Two-component transcriptional regulator (With NarX) of nitrate reductase; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	30.1%	86.7	1.5e-18
<input type="checkbox"/> AIB11842.1	Azospirillum brasilense	Putative transcriptional regulator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	26.6%	66.2	2.1e-12
<input type="checkbox"/> dctR	Azospirillum brasilense	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulator, LuxR/FixJ family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	26.4%	52.0	4.1e-08

Figura 13. Análisis de las proteínas con alta identidad con LibR. Tabla de resultados de porcentajes de identidad contra las proteínas registradas en la plataforma STRING

Dado que la proteína FlcA mantiene la mayor identidad con nuestra proteína de interés (LibR), se tomó como referente para explorar posibles interacciones proteicas. Los resultados obtenidos nos arrojan cuatro principales interacciones, todas con cinasas histidina y proteínas pertenecientes a sistemas de doble componente. Según el código de interpretación, hay líneas

de co-ocurrencia de genes y proteínas homólogas en todas las conexiones (Figura 14).

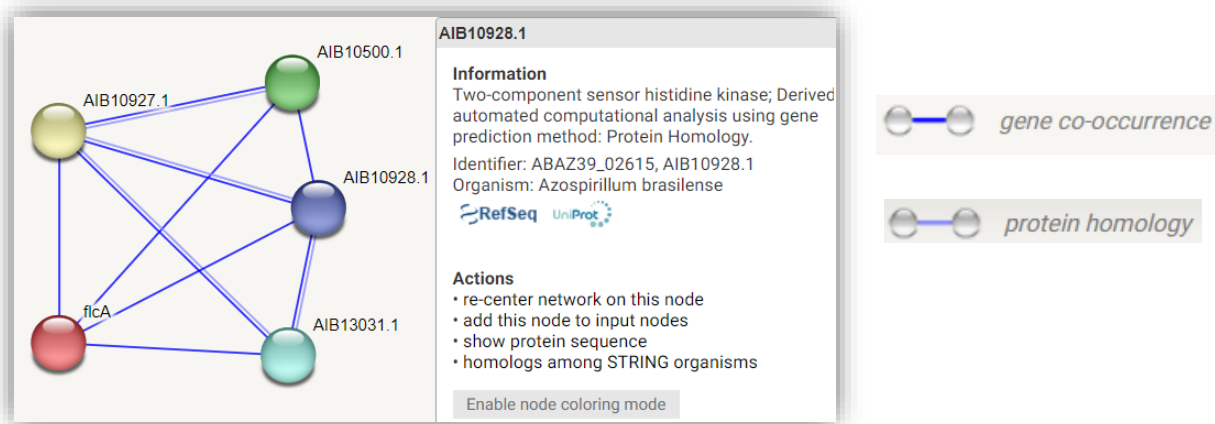


Figura 14. Análisis de la interacción de la proteína FlcA de *A. brasilense*. Mapa de las interacciones de la proteína con mayor porcentaje de identidad a LibR (rojo) con otras proteínas, sus interacciones directas se dan con cinasas histidinas y proteínas pertenecientes a sistemas de doble componente. Simulación en la plataforma STRING.

Análisis de la proteína MibR en la plataforma STRING

Al ingresar la información de la proteína MibR a la plataforma STRING lo que obtenemos es una proteína con el 99.4 % de identidad

protein	organism	annotation	identity	bitscore	e-value
<input checked="" type="checkbox"/> AIB13047.1	Azospirillum brasilense	Putative transcriptional regulator, MarR family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	99.4%	318.2	2.4e-88
<input type="checkbox"/> AIB11892.1	Azospirillum brasilense	Transcriptional regulator, MarR family; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Protein Homology.	33.7%	68.2	4.3e-13

Figura 15. Análisis de las proteínas con alta identidad respecto a MibR. Tabla de resultados de porcentajes de identidad contra las proteínas registradas en la plataforma STRING.

Al seleccionar, esta proteína se observa una extensa red de posibles interacciones y la mayoría de las proteínas que tienen interacción con MibR en su mayoría son de función enzimática. Se realizó una búsqueda de cada una de las interacciones establecidas con la proteína de interés, pero ninguna participa en la biosíntesis del AIA ni la vía del triptófano, sin embargo, lo que resalta de este análisis es la línea de interacción que se marca con una

proteína putativa de la familia TetR que es parte de la familia de LuxR y aunque esta interacción no está del todo clara, se muestra una línea de interacción que marca “una interacción prevista” (co-ocurrencia) es decir, que existen genes dentro de estas interacciones cuyos patrones en los genomas muestran similitudes y/o se encuentran en el mismo contexto genético en distintas especies.

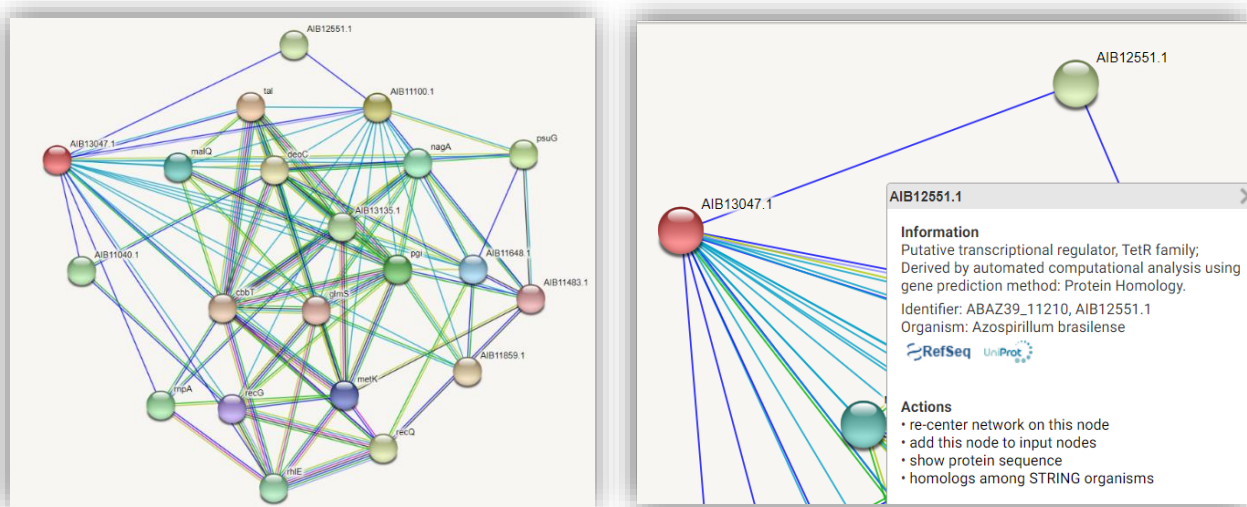


Figura 16. Análisis de la interacción de la proteína homologa a MibR de *A. brasilense*. A) Mapa de las interacciones de la proteína homologa a MibR (rojo) con otras proteínas, b) Información obtenida de la relación entre la proteína MibR y la proteína putativa de tetR. Simulación en la plataforma STRING.

Estos datos sugieren que a la fecha no existe información acerca que de proteínas de la familia MarR y LuxR interactúen de manera directa ya que los residuos de unión son muy específicos para cada familia y para cada proteína y pueden variar mucho incluso entre proteínas de la misma familia.

Identificación de los posibles sitios de unión entre las proteínas LibR y MibR al ADN a través de análisis *in silico*

Análisis de la secuencia de la proteína LibR

Se realizó un alineamiento de la secuencia de LibR con las proteínas homologas con los siguientes porcentajes de identidad: DosR (29%) de *Mycobacterium tuberculosis*, VraR

(29%) de *Enterococcus faecium* y FlcA (63%) de *Azospirillum brasilense*. Se identificó el dominio REC en el cual están los sitios de fosforilación D8, D9 y D54 (Figura 17) presentes en todos los homólogos, por otro lado, se identificó también el dominio HTH la cual tiene una lisina de unión al ADN conservada. De igual forma, se localizó el área del linker, la cual es llamada así debido a que es la parte del monómero donde interacciona con otro monómero para formar homodímeros, y que generalmente tienen una baja conservación debido a que cada proteína se une de diferente forma y en diferentes residuos a su monómero (Figura 11). Es importante hacer mención de que estos residuos de la proteína están presentes en las secuencias tanto de DosR, VraR y FlcA que son proteínas homologas a LibR, y que por lo tanto sugieren que cumplen una función importante.

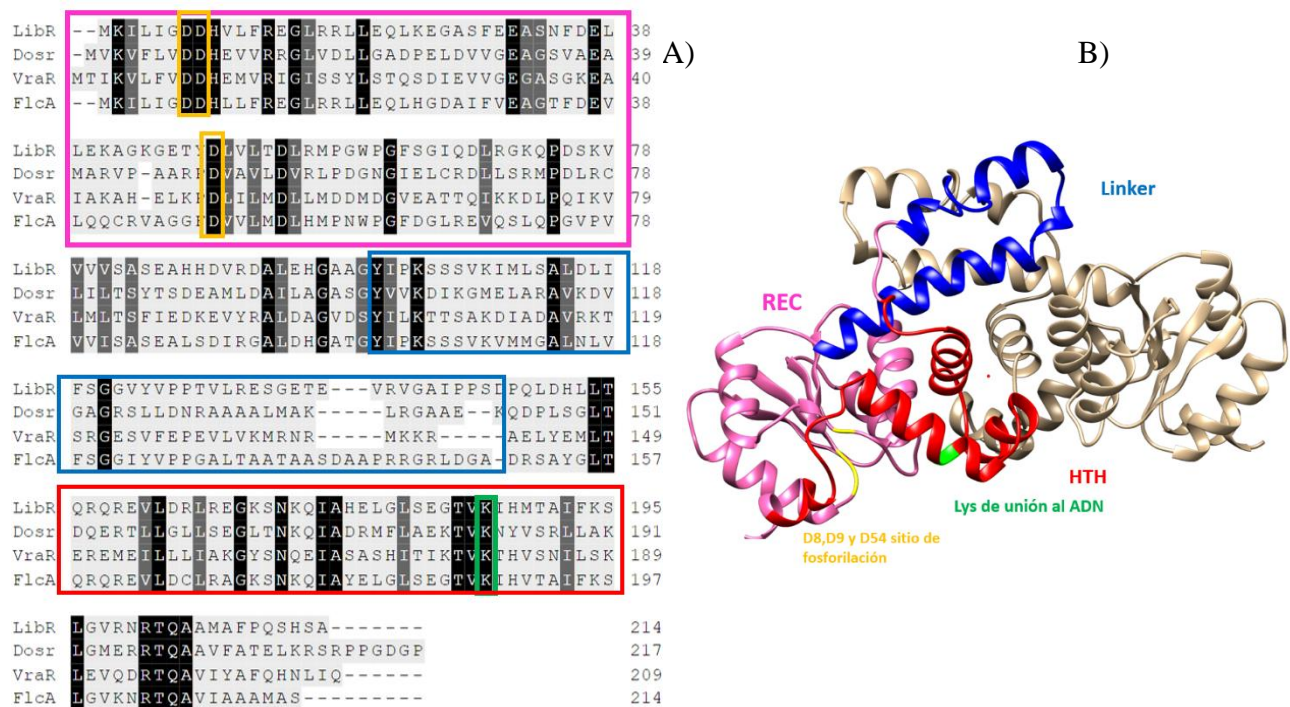


Figura 17. Alineamiento de secuencia de la proteína LibR contra proteínas homologas. A) La sección encerrada en rosa representa el dominio REC con los sitios de fosforilación D8, D9 y D54 remarcados en amarillo, la sección remarcada en azul es el área llamada “linker” y en rojo el dominio HTH con la lisina de unión principal al ADN remarcada en verde. LibR *Azospirillum brasilense*, DosR de *Mycobacterium tuberculosis*, VraR de *Enterococcus faecium*, FlcA de *Azospirillum brasilense* (Alineamiento realizado en MULTIPLE ALING SHOW). B) Modelado de la proteína LibR con sus dominios importantes.

Análisis de la secuencia de la proteína MibR

Para el caso de la proteína MibR se realizó un alineamiento de la secuencia contra un regulador transcripcional de la familia MarR de *Rhodopseudomonas palustris* llamado CouR, esto debido a que en el modelado por homología de MibR solo arrojó moldes con esta especie para proteínas homologas ya que los miembros de la familia MarR (Figura 18), se caracterizan por no tener una identidad alta en su secuencia entre sí, pero si es su estructura secundaria, en el caso de la proteína de interés MibR la búsqueda de un templado fue exitosa ya que es muy similar en cuanto a identidad y estructura. Según la bibliografía acerca de CouR las interacciones específicas de base ocurren en la hélice $\alpha 4$ entre la asparagina 107 y la prolina 106 marcadas en verde (Figura 18).

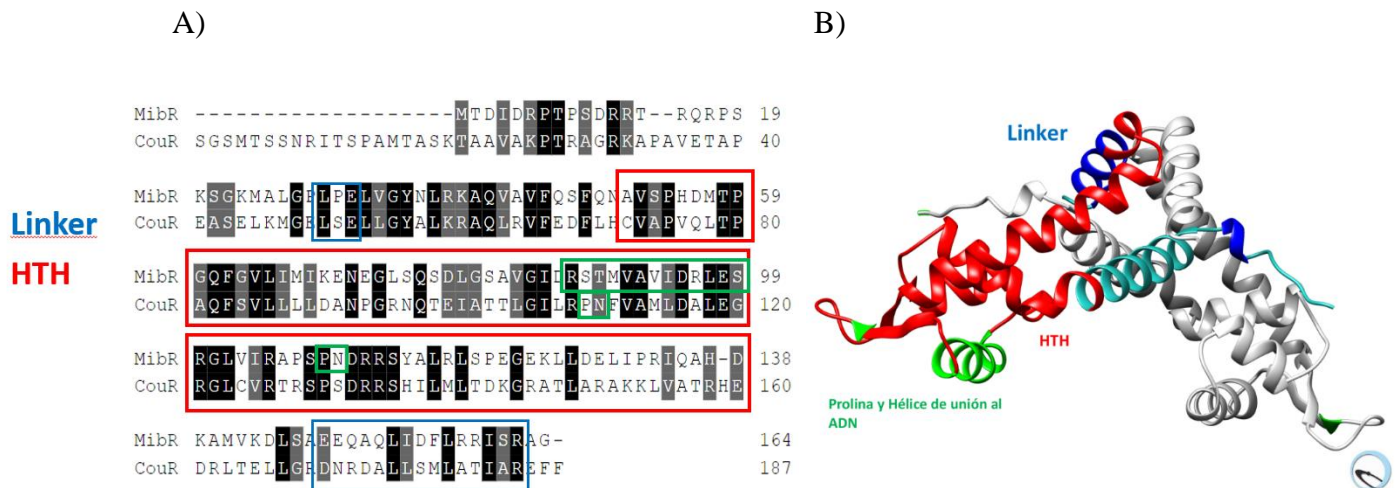


Figura 18. Alineamiento de secuencia de la proteína MibR contra CouR proteína homologas. A) La sección encerrada en rojo representa el dominio HTH, en verde la prolina 106 y la asparagina 107, al igual que la hélice de unión al ADN, la sección remarcada en azul es el área llamada “linker”. (Alineamiento realizado en MULTIPLE ALING SHOW). B) Modelado de la proteína MibR con sus dominios importantes.

Sitios que mutar en la región promotora del gen *ipdC*

Propuesta de mutaciones para LibR

Con el fin de identificar los posibles sitios de unión de las proteínas MibR y LibR al ADN,

se propone crear mutaciones puntuales, específicamente sustituciones en puntos clave de la secuencia palindrómica encontrada en la región promotora del gen *ipdC*. Para ello nos basamos en el experimento de Yagi et al., 2001 en *Azospirillum lipoferum* la cual es 100% idéntica a la de *A. brasilense* Sp7 (Figura 19A). Al realizar mutaciones en ciertos nucleótidos de la secuencia palindrómica, se observaron cambios negativos en la unión de dos proteínas identificadas en esta región promotora (Figura 19 B), sin embargo, en dicho artículo no se caracterizan a las proteínas de estudios y solo se les refiere como proteínas A y B.

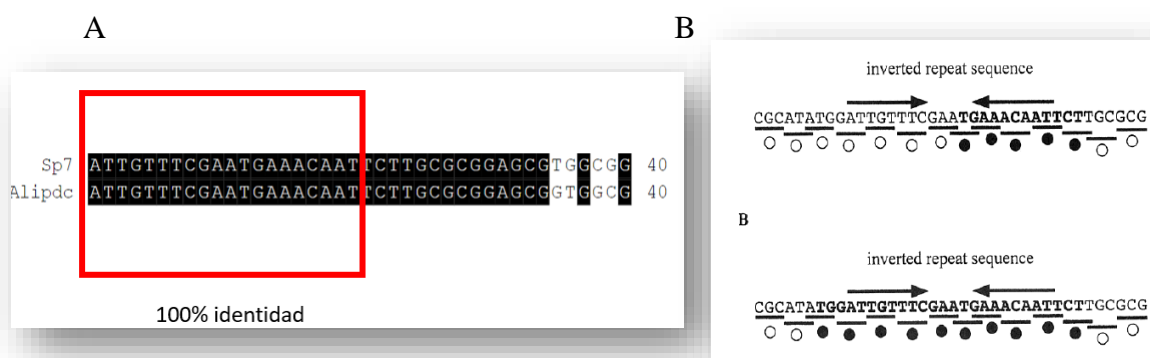


Figura 19. Análisis de la secuencia palíndrome presente en la región promotora del gen *ipdC* de *A. lipoferum* y *A. brasilense*. A) alineamiento de la secuencia palíndrome. B) Bases que al ser mutadas afectaron la unión de las proteínas A y B al ADN (círculos negros) (Yagi et al., 2001).

Al conocer esta información, nuestro interés se centró en los sitios que fueron mutados y que produjeron una disociación de las proteínas a dicha región en el trabajo de Yagi y colaboradores, de tal manera que partamos de una información experimental probada previamente en la misma región palíndrome. Aunado a ello, la información recopilada en el trabajo de (Bi et al., 2018) se sabe que cada subunidad del dominio HTH se une a la secuencia palindrómica del ADN y principalmente la Lisina 182, ya que en los experimentos al mutar esta lisina en la proteína homóloga DosR, perdía la total afinidad por el ADN debido a la carga positiva que tiene este aminoácido que se ve atraída a la carga negativa del ADN. Esta interacción se da mediante puentes de hidrogeno con dos purinas de la secuencia diádica. Además, la lisina 182 esta conservada en varios homólogos de LibR, al igual que las mismas purinas (adenina y guanina) conservadas en la secuencia palindrómica, al existir esta misma

conservación que en el homólogo DosR, lo que se propone es tomar estos sitios como puntos clave para las mutaciones. Posteriormente, se procedió a hacer un análisis de la secuencia de la proteína y su unión a la secuencia palindrómica del ADN (Figura 20). Al encontrarse conservadas se propone realizar una mutación por sustitución en estas bases, realizando una transversión (purina por pirimidina) para evitar posible compatibilidad de la lisina por otra purina y también tomando en cuenta el experimento previo de (Yagi et al., 2001) donde ya fueron realizadas mutaciones para el mismo experimento pero en otro modelo de estudio (*Azospirillum lipoferum*).

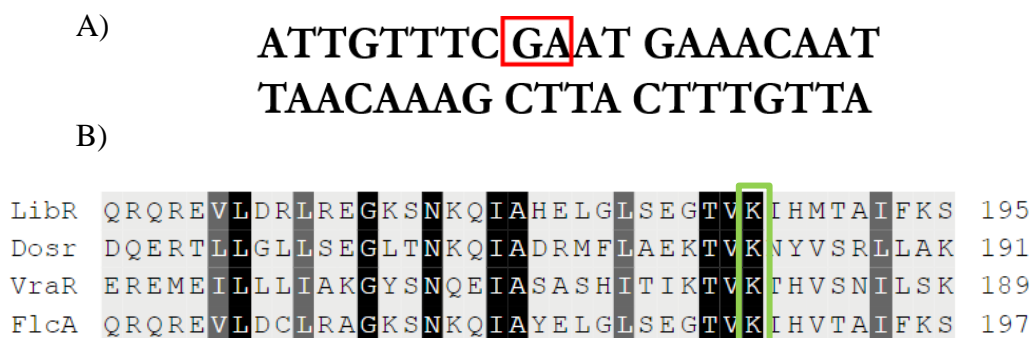


Figura 20. Análisis de secuencias de Interacción entre el ADN y los reguladores transcripcionales. A) Secuencia palindrómica de la región promotora del gen *ipdC*, donde se encuentran conservadas la guanina y adenina (rojo) donde se une la lisina 182 de DosR. B) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de homólogos de LibR donde esta conservada la lisina de unión al ADN (verde).

Propuesta de mutaciones para MibR

La secuencia palindrómica que ocuparía MibR para su unión al ADN es la misma que ocupa LibR (Figura 20), de igual forma se busca identificar los posibles sitios de unión de MibR al ADN y se propone crear sustituciones en puntos clave de la secuencia palindrómica encontrada en la región promotora del gen *ipdC*, en el experimento anterior fueron encontradas las purinas que se propone interactúan con el residuo de lisina presente en LibR, pero en el experimento mencionado (Figura 21A) una de las dos proteínas de unión no se unía por completo al ADN, casualmente estas bases se encuentran conservadas en la secuencia de unión del homólogo de MibR, CouR (Figura 21B).

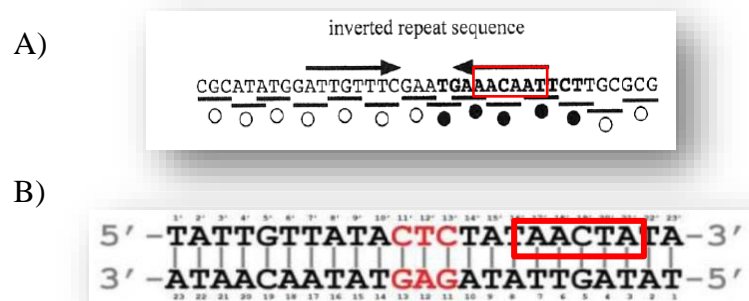


Figura 21. Análisis de secuencia invertida repetida en *Azospirillum sp.* y *Rhodopseudomonas palustris*. A) Secuencia palindrómica de la región promotora del gen *ipdC* en *Azospirillum lipoferum*, donde se encuentran conservadas las bases AAC W A (rojo). B) Secuencia palindrómica a la que se une la proteína CouR homólogo de MibR, donde se encuentran conservadas las bases AAC W A.

Cada monómero de MibR se une a cada mitad de la secuencia repetida invertida a través de interacciones con el motivo HTH, en el artículo de (Cogan et al., 2018) indican que la única interacción específica de base ocurre en la hélice $\alpha 4$ entre la asparagina 107 y la Adenina 15 y los contactos de Van der Waals con las bases de ADN de la secuencia de reconocimiento se dan por la Prolina-106 en el segmento que abarca las timinas 6 y 7 de una hebra (Figura 22).

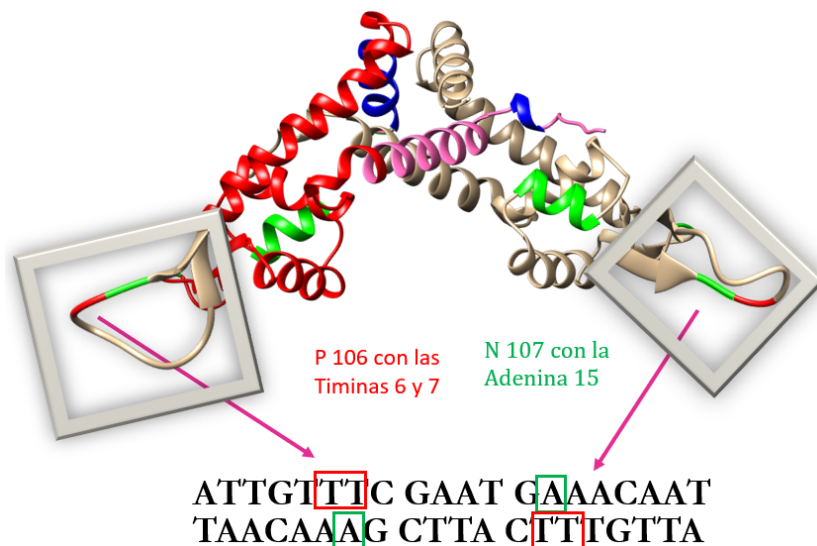


Figura 22. Modelado por homología de MibR. Representación de residuos de unión al ADN basándonos en la información de (Cogan et al., 2018) donde en el homólogo CouR la prolina 106 (rojo) se une a las timinas 6 y 7 (verde) y la asparagina 107 se une a la adenina 15.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Evaluación de distintas estrategias para la purificación de LibR.

Inducción de la proteína en *E. coli* BL21

Se trabajó en la inducción de la proteína LibR con el fin de realizar su purificación y posterior a esto la realización de un ensayo EMSA, para comprobar una posible interacción entre las proteínas de interés y el ADN. Lo que sucedió con la proteína LibR es que, al realizar la inducción, y separar sobrenadante y pellet, se observó que se mantiene en cuerpos de inclusión en el pellet, dificultando su purificación, por lo que en este trabajo se probaron diferentes métodos y técnicas para poder sustraerla de los cuerpos de inclusión. Se partió de la cepa *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido de expresión pGEXGST-libR, que contiene la secuencia codificante de la proteína LibR fusionada al gen *gst* (glutation-s-transferasa). Las primeras inducciones realizadas en BL21 fueron con las condiciones: 30°C, 0.5 a 0.6 de D.O, 0.1 mM de IPTG, 3 horas de inducción. Estas condiciones resultaban en la expresión de la proteína, pero formando cuerpos de inclusión (Figura 23), haciendo difícil la posterior purificación, como control se observa la proteína GST soluble.

En estos intentos para obtenerla en el sobrenadante se diseñaron diferentes estrategias en las cuales se evaluaron diferentes condiciones en la inducción, como distintos tiempos de inducción, diferentes concentraciones de inductor y temperaturas de incubación. De estas condiciones probadas en *E. coli* BL21 realizando 4 repeticiones de extracto total, pellets y sobrenadantes, las condiciones que dieron mejores resultados de inducción de proteína libre en sobrenadante fueron: 16°C, 3 horas de inducción, 0.05 mM IPTG, 0.4 D.O. Lo que resultó en que pasara cierta cantidad de la proteína al sobrenadante en esas condiciones, pero aún no es la que se esperaba para la posterior purificación, así que se buscó otra estrategia para lograrlo (Figura 24).

PROTEINA	LibR y pGEX					
CARRIL	1	2	3	4	5	6
MUESTRA	LibR Pellet No inducido	LibR Pellet Inducido	LibR Sobrenadante/No inducido	LibR Sobrenadante/Inducido	Marcaador	pGex Inducido

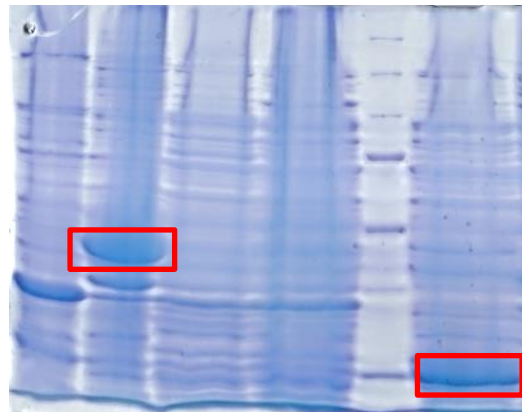


Figura 23. Análisis de inducción de la proteína LibR en *E. coli* BL21. La imagen muestra un gel de acrilamida al 10% que contiene las proteínas separadas a partir del paquete celular o sobrenadante de cultivos de *E. coli* inducidos con IPTG durante 3 horas. Se aprecian bandas de inducción en el paquete celular (P) pero no en el sobrenadante (SN).

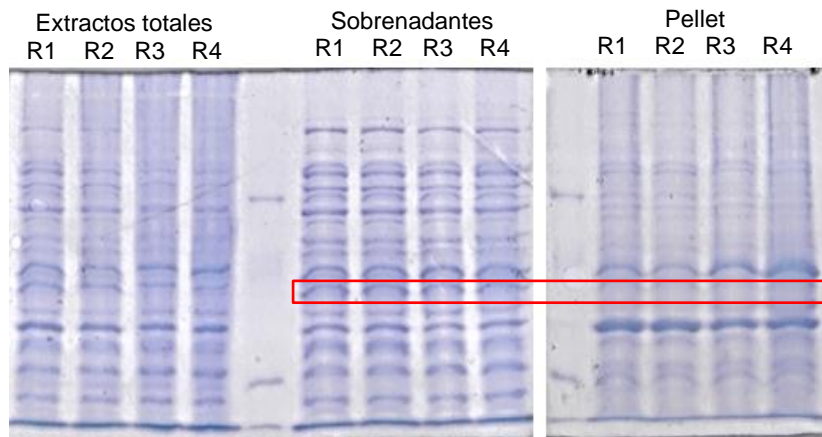


Figura 24. Gel resultante del SDS-PAGE de LibR en BL21. Extracto total, sobrenadante (SN) y pellet, inducción a 16°C, se aprecian bandas de inducción en el sobrenadante. Repeticiones (R)

Estrategia alternativa para la purificación de LibR.

Como medida alternativa, se decidió usar la cepa *E. coli* Rosetta pLysS para los posteriores experimentos, la cual fue donada por el departamento de biología celular del CINVESTAV. A partir de una alícuota en medio LB con la cepa, se realizó precultivo, se dejó crecer durante toda la noche y se procedió a hacer una conservación en glicerol. Para corroborar que fuera la cepa sin contaminación se realizó siembra en LB + Cm donde se corroboró su crecimiento en cloranfenicol ya que *E. coli* Rosetta pLysS es resistente a este antibiótico, posterior a esto se realizaron células competentes. La cepa de *E. coli* Rosetta y BL21, son utilizadas comúnmente para la inducción de proteínas, sin embargo, las cepas huésped de Rosetta son derivados de BL21 diseñados para mejorar la expresión de proteínas que contienen codones que rara vez se usan en *E. coli*. Diferentes trabajos mencionan (Fathi-Roudsari et al., 2016) que *E. coli* BL21 muestra el mayor nivel de expresión en cuerpos de inclusión a comparación de *E. coli* Rosetta.

Extracción del plásmido pGEXGST-libR de la cepa BL21

De acuerdo con el método Minipreps of plasmid DNA, las células de 3 mL de un precultivo de la cepa *E. coli* BL21 incubadas durante toda la noche, se recuperaron por centrifugación y se procedió a realizar la lisis alcalina como se describió anteriormente en métodos. Se realizaron dos dos tubos de lisis, y se obtuvo mayor cantidad de ADN plasmídico en la muestra numero 2 (ADN plasmídico 2).



Figura 25. Resultado de la electroforesis de la lisis alcalina de *E. coli* BL21. Carril 1 y 2 extracción del ADN plasmídico (pGEXGST-libR) de cepas *E. coli* BL21, se observan bandas de presencia de ADN. Gel de agarosa al 1%.

Transformación pGEXGST-libR en *E. coli* Rosetta pLysS

Del proceso de transformación con células competente de *E.coli* Rosetta pLysS y el ADN plasmídico (pGEXGST-libR) obtenido de la extracción, resultaron dos cajas con colonias, sin embargo se observó una mayor cantidad de ufc en las transformantes con la muestras que contenía mayor cantidad de ADN en la electroforesis.

Inducción de la proteína LibR en *E.coli* Rosetta pLysS

Se realizó una nueva inducción donde se probaron distintas condiciones como: temperatura, tiempo de inducción, D.O y concentración de IPTG. De esas condiciones se evaluaron en las que hubo mejores resultados basándonos en las inducciones evaluadas que se obtuvieron con *E.coli* BL21. Con las condiciones en las cuales se obtuvieron mejores resultados son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 3. Condiciones evaluadas de inducción de la proteína LibR en *E. coli* Rosetta pLysS

Condición evaluada	Variantes	Resultado
Inductor (IPTG)	0.025, 0.05, 0.1 mM	0.05
Tiempo	0.5h, 1h, 2h, 3h	3 horas
Temperatura	16°C, 30°C, 36°C	30°C
D.O	0.5, 0.4, 0.3	0.3
Buffer de lisado	PBS 1X, Laemli, Tritón	PBS 1X
Sonicación	Continua, por pulsos	Por pulsos

En la figura siguiente se muestra un SDS-PAGE representativo con las condiciones evaluadas para la obtención de la proteína LibR en el sobrenadante o pellet.

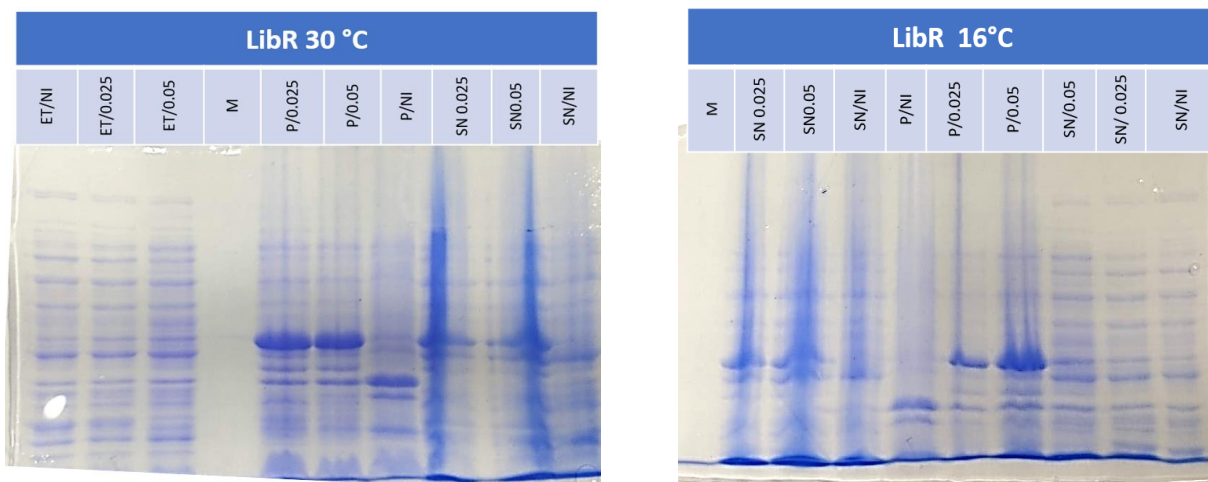


Figura 26. Resultado del SDS-PAGE, gel de acrilamida al 10%. Condiciones de inducción: 0.3 de D.O en la cual se utilizaron diferentes concentraciones de IPTG (0.05 mM y 0.025 mM) durante 3 horas a 16° y 30 °C. Extracto total (ET), no inducido (NI), marcador (M), sobrenadante (SN).

Posterior a la evaluación de condiciones, se realizó la inducción con las variantes que dieron mejor resultado: inducción con .05mM de IPTG, 30°C por 3 horas con 150rpm corriendo los extractos totales, pellets y sobrenadantes. Estos resultados se confirmaron mediante la técnica de western blot, donde es notoria una mayor inducción en la proteína expresada en *E. coli* Rosetta pLysS.

Carril	1	2	3	4	5	6
Proteína	MibR	LibR BL21	LibR Rosetta	pGEX		Marcador



Figura 27. Resultado del western blot. Se utilizó el anticuerpo anti-GST. En el primer carril se muestra a la proteína MibR, en el carril 2 a la proteína LibR de BL-21, en el carril 3, LibR en Rosetta, carril 4 GST y en el carril 6 el marcador de peso molecular.

La transformación de la cepa Rosetta con el plásmido GST-LibR, permitió la obtención de una mayor cantidad de proteína en el sobrenadante, la cual bajo estas condiciones se puede utilizar para su futura purificación.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente existen diversos estudios que indican en evidencia que las rizobacterias han mejorado el crecimiento, la producción y la salud de las plantas ya sea por mecanismos directos o indirectos, en muchas de las investigaciones actuales existe un interés creciente en los microorganismos benéficos del suelo ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas mediante interacciones simbióticas que han sido evaluadas a lo largo de los años para entender como las bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPB) incrementan el crecimiento y productividad vegetal. Dentro de estas PGPB estudiadas, se encuentran las pertenecientes al género *Azospirillum*, la cual es una bacteria diazotrofa y de la cual su principal modo de acción para la promoción de crecimiento es la fitoestimulación mediante la producción de varias fitohormonas que alteran la morfología y el metabolismo de la planta, principalmente el ácido indolacético (AIA), aunque este mecanismo es aun prácticamente desconocido respecto a la expresión y regulación transcripcional, es de recalcar la importancia del gen *ipdC* el cual codifica la enzima llamada indol piruvato descarboxilasa, esta enzima interviene hasta en un 90% en la biosíntesis total de AIA en la bacteria y hay que destacar que existe una baja cantidad de estudios del gen *ipdC* así como de las vías de biosíntesis de AIA y los genes implicados en cada una de ellas. En el trabajo de (Coulson & Patten, 2015) hablan del factor de transcripción TyrR y como controla la expresión de genes implicados en la captación y el metabolismo de los aminoácidos aromáticos y demuestran que en la rizobacteria *Enterobacter cloacae* UW5, la expresión del gen *ipdC* está controlada por TyrR y debido a este hallazgo es que Jijón Moreno en 2017 quiso corroborar si TyrR regula la transcripción del gen *ipdC*, así que mutó TyrR a pesar de la existencia de un sitio de unión putativo para el factor sigma RpoN en el promotor de *ipdC* no se vio afectada la biosíntesis de AIA, por lo tanto surge la duda de: ¿Qué está regulando al gen *ipdC*?

En el promotor de *ipdC* de *A. baldaniorum* Sp245 están presentes diferentes elementos en *cis* que pudieran ser importantes para la expresión del gen como lo son: un elemento de respuesta a auxinas, un probable sitio de unión para el factor σ 54, un probable sitio de unión a ribosoma, un sitio de inicio de la transcripción, una repetición invertida (ATTGTTTC(GAAT)GAAACAAT) y dos secuencias palíndromes (Vande Broek et al.,

2005) (Yagi et al., 2001). Estos elementos están presentes en la región promotora del mismo gen en *A. brasilense* sp7. Jijón Moreno propone que la regulación de la biosíntesis de AIA podría estar mediada por reguladores transcripcionales que utilizan esta auxina como ligando para modular la transcripción de *ipdC*, esta hipótesis es apoyada por el hecho de que en el promotor de *ipdC* existe esta repetición invertida mencionada, que es importante para la inducción de la expresión de *ipdC* por el AIA (Vande Broek et al., 2005) y se propone sería el sitio de unión para algún factor de transcripción que utiliza el AIA como ligando para modular la expresión de *ipdC*. En el trabajo de (Yagi et al., 2001) un EMSA mostro la presencia de dos proteínas de unión al ADN, que como mencionan podrían estar participando en la regulación y expresión del gen *ipdC* al igual que en el trabajo de (Jijón Moreno, 2017). Inicialmente de acuerdo a los antecedentes, fueron identificadas identificadas dos proteínas que se unen a la región intergénica del gen *ipdC*, y las denominaron MibR y LibR y debido a su posible participación en la biosíntesis del ácido indól acético (AIA) y a los dominios que presentaba fueron clasificadas como miembros de la familia de reguladores transcripcionales MarR y LuxR (Jijón Moreno, 2017). Esta descrito que los miembros de estas familias actúan como homodímeros pero se desconoce si las proteínas MibR y LibR podrían interactuar entre ellas para así poder potenciar su efecto como posibles reguladores transcripcionales.

En este trabajo se analizó la posible interacción de dichas proteínas, como parte del estudio de la regulación del gen *ipdC* que permitirá aportar información sobre la regulación a nivel transcripcional de la biosíntesis del AIA y a futuro sugerir los mecanismos de acción de las proteínas MibR y LibR. Actualmente, se ha logrado predecir las estructuras 3D así como interacciones entre proteínas gracias a la bioinformática. De acuerdo con el presente trabajo, el modelado por homología de la proteína MibR arrojó que la estructura terciaria está constituida por 6 alfa hélices y 2 beta plegadas según lo predicho por la plataforma SWISS MODEL y el software CHIMERA. Así mismo, la predicción de (Jijón Moreno, 2017) a través de la plataforma PHYRE2 dieron los mismos resultados que el trabajo de tesis de (Yáñez Meza, 2022) donde la estructura fue predicha a través de la plataforma I-TASSER, lo que permite comprobar la misma estructura en distintas plataformas.

El modelo por homología de este trabajo se obtuvo en SWISS MODEL, debido a que nos brinda la predicción estructural de proteínas a partir de la elección de un molde, debido a la

falta de cristales de la proteína de interés en el PDB. La búsqueda se inicia con la secuencia primaria de una proteína con estructura desconocida, la plataforma identifica una o varias proteínas homologas con estructura conocida en el PDB, basándose en el mayor porcentaje de identidad con la proteína de interés, después se ajustan los aminoácidos de las proteínas homologas para que coincidan con la estructura de la proteína de interés (Arreola-Barroso et al., 2022). Posterior a esto, se compara y evalúa la estructura de las homologas con la proteína de interés, utilizando parámetros estadísticos que califican la calidad de dicho modelado. Finalmente, los modelos pueden ser analizados en programas para visualización, como CHIMERA, para entender mejor el modelado.

En el caso de la proteína MibR, la familia de reguladores transcripcionales MarR mantienen una baja homología incluso a nivel de especie respecto a su secuencia de aminoácidos (Wilkinson & Grove, 2006), pero al crear el modelado por homología en SWISS MODEL se obtuvieron mejores coincidencias entre las proteínas más parecidas a nivel de estructura terciaria con MibR como se indica en los resultados, de tal manera que se realiza un modelado basado en la búsqueda de proteínas con el mismo plegamiento (Yáñez Meza, 2022).

El modelo generado con SWISS-MODEL permitió obtener un modelo de MibR más cercano a la manera en que actúan naturalmente los miembros de la familia MarR, es decir en forma de homodímero, ya que los estudios estructurales de los homólogos de MarR revelan dos conjuntos de α hélices: N- y C-terminales que facilitan la dimerización y dos motivos de hélice-giro-hélice alados (wHTH) que se unen al dúplex de ADN palindrómico y que están conservadas en MibR, cada monómero se une a un medio sitio de la secuencia repetida invertida del ADN palindrómico (Cogan et al., 2018).

En cuanto a la proteína LibR se tomó como referencia a DosR de *Mycobacterium tuberculosis*, que es un regulador de respuesta de sistemas de doble componente y con la cual las bases de PDB arroja una alta conservación a nivel de estructura terciaria. Es importante destacar que los genes que participan en quorum sensing, pueden encontrarse en una determinada disposición local (topológicamente hablando), siendo ortólogos aparentes entre sí, es decir; que se especializaron en una cierta función, mientras que éstos mismos son parálogos entre sí cuando se encuentran en diferentes disposiciones topológicas (Hudaiberdiev et al., 2015), es por eso que DosR es muy similar a LibR. Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR están implicados en un sistema de señalización conocido

como “quorum sensing” aunque LibR se agrupa dentro de esta familia, no posee un dominio de unión al autoinductor, pero se identificó un dominio REC característico de los reguladores de sistemas de doble componente (Chen & Xie, 2011). Este sistema involucra a la cinasa histidina que, tras detectar una determinada señal del entorno, se autofosforila en un residuo de histidina y posteriormente, este grupo fosforilo es transferido a un residuo de ácido aspártico (D) del dominio REC del regulador transcripcional, promoviendo un cambio conformacional favoreciendo la formación de homodímeros para unirse a secuencias específicas del DNA (Birck et al., 1999). DosR posee un residuo catalítico de Asp54, involucrado en la reacción de fosforilación y curiosamente en LibR existe la presencia de un residuo D en la posición 54 conservado en el dominio REC, lo cual sugiere que la fosforilación es un requisito para modular su actividad reguladora para el ADN. El alineamiento de secuencias, también identificó el dominio REC los sitios de fosforilación D8, D9 y D54, la fosforilación del Asp54 catalítico presumiblemente conduce a un cambio conformacional que mejora la afinidad de unión de DosR a su secuencia de ADN afín y activa la transcripción de genes regulados (Wisedchaisri et al., 2008). En cuanto al dominio HTH el cual abarca del aminoácido 151 al 208 tiene una lisina de unión al DNA conservada y presente en diferentes homólogos de LibR (Bi et al., 2018), en el trabajo de (Bi et al., 2018) nos hacen mención de que DosR hace numerosos contactos de proteína-base de ADN utilizando solo tres residuos de aminoácidos por subunidad, pero haciendo hincapié directamente en la lisina 182 ya que se realiza un experimento donde este residuo mutado (Lys182) afectó significativamente la unión de la proteína al ADN, y este residuo se encuentra conservado en todos los homólogos de la proteína LibR. Finalmente, en LibR se localizó un área “linker” (Figura 14) que abarca los aminoácidos 98 a 149, que sería la parte intermedia entre los dominios N- y C-terminal. Esta área del linker contiene las alfa hélices 5 y 6 las cuales son responsables de la dimerización ya que se unen con la otra subunidad del monómero (Wisedchaisri et al., 2008). Los elementos canónicos presentan una fuerte conservación de elementos estructurales secundarios con otros reguladores transcripcionales como DosR, VraR y FlcA que son proteínas homologas a LibR, y que por lo tanto se sugiere cumplen una función importante.

Otro enfoque que se tomó fue el uso de la plataforma STRING, la cual combina las interacciones proteína-proteína de múltiples fuentes bibliográficas y experimentales, por lo

cual constituye una gran red disponible para sugerir posibles interacciones. Al ingresar la secuencia aminoacídica de MibR a la plataforma, se obtuvo una proteína con el 99.4% de identidad (Figura 13) que a pesar de contar con una extensa red de interacciones ninguna estaba implicada en la biosíntesis del AIA, que pudiera aportar información acerca de su participación en la regulación del gen *ipdC* y a su vez la biosíntesis de AIA, pero algo relevante de este análisis fue que se mostró una línea de interacción con una proteína de la familia TetR la cual es miembro de la superfamilia LuxR (Pompeani et al., 2008) y aunque esta interacción prevista aún no está del todo clara, el color de la línea indica coocurrencia es decir, que en ciertos microorganismos estas familias de genes o algunos homólogos son utilizados en conjunto, pero no nos da como tal una unión de las proteínas.

En cuanto a la información obtenida de la secuencia aminoacídica de LibR, no se obtuvo el mismo éxito en la búsqueda al ingresar la proteína a la plataforma, ya que la más parecida registrada para *Azospirillum brasilense* es FlcA con una identidad del 63%, este es un regulador transcripcional de la familia LuxR que controla la floculación de las células y la colonización de la superficie de la raíz de la plantas (Hou et al., 2014) y en cuanto a sus interacciones podemos observar que la mayoría se dan con cinasas histidinas, las cuales son parte de los sistemas de doble componente, como se mencionó en un inicio. Estos datos indican que esta proteína aún no está del todo identificada en esta plataforma de complejos de proteínas, en la cual se consideran diferentes metodologías experimentales para encontrar interacciones. Cabe mencionar que la posible interacción intervendría en el modelo propuesto por (Jijón Moreno, 2017) debido a que en este modelo MibR se une al promotor en ausencia de AIA activando la expresión de *ipdC* pero al comenzar la síntesis de AIA alcanzando un nivel basal que le permite unirse a MibR provoca un cambio conformacional que causa que éste se disocie del ADN y esto querría decir que actúa como un “repressor” y en la fase estacionaria de crecimiento, la alta concentración de AIA mantiene a MibR en su estado inactivo permitiendo la unión de LibR fosforilado al promotor el cual posiblemente interactúa con la RNA polimerasa y con el factor σ 54 para activar la expresión de *ipdC* a una mayor tasa de expresión, lo que sugiere que LibR actuaría como un activador, siendo así que LibR y MibR al actuar como factores de transcripción contrarios, sería poco probable su posible interacción.

De acuerdo a las referencias que se obtuvieron se propone crear estas sustituciones en puntos clave, basándose en los experimentos realizados (Yagi et al., 2001), donde mutaron nucleótidos de la secuencia palíndroma, ellos observaron cambios negativos en la unión de una proteína a esta región, aunque son prácticamente los nucleótidos de toda la región diádica, los sitios comprobados en estos experimentos fueron llevados a cabo en el modelo de estudio: *Azospirillum lipoferum* el cual tiene una identidad del 100% con la secuencia diádica encontrada en la región promotora del gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* información ya tendríamos en ya que la identidad de la secuencia comparado con la de es del 100 %.

Gracias a la información recopilada se sabe que cada subunidad del dominio HTH principalmente la Lisina 182 se une a la secuencia palindrómica del ADN como se mencionó anteriormente, ya que al mutar esta lisina, la proteína homóloga a LibR perdía la total afinidad por el ADN debido a la carga positiva que tiene este aminoácido que se ve atraída a la carga negativa del ADN, este residuo de Lys de la proteína homóloga de LibR (DosR) se une mediante enlaces de hidrogeno con dos de las purinas de la secuencia diádica que son la adenina y guanina y que podemos tomar como puntos clave para las mutaciones por sustitución. De igual forma en el trabajo de (Yagi et al., 2001) para el caso de la segunda proteína solo ven una alteración en la unión de la proteína al ADN en la segunda mitad de la secuencia diádica lo cual no concuerda con la información acerca de que esta proteína igualmente trabaja en homodimeros ya que cada monómero se une a cada mitad de la secuencia repetida invertida a través de interacciones con el motivo wHTH. Algo interesante que se encontró en la literatura fue que las mutaciones concuerdan con las bases de interacción con el ADN del experimento con un homólogo de la proteína MibR (CouR) donde como se mencionó la interacción de base ocurre entre la Prolina-106, asparagina 107 y la Adenina 15 con las bases de ADN de la secuencia de reconocimiento en las timinas 6 y 7 de una hebra (Figura 23). Siendo esa la información recopilada se sugiere llevar a cabo mutaciones puntuales realizando transversiones, en los sitios de la secuencia palindromica ya mencionados.

En cuanto a los resultados experimentales se trató de purificar en una cantidad significativa estas dos proteínas con el fin de realizar un EMSA y poder verificar la interacción de estas

proteínas con la secuencia palíndrome. Al llevar a cabo la expresión de las proteínas y separar sobrenadante y pellet, LibR se mantuvo en cuerpos de inclusión dificultando su purificación, por lo que se recurrió a métodos alternativos para evitar este problema, como lo son: distintos tiempos de inducción, diferentes concentraciones de inductor y temperaturas de incubación (probadas en *E. coli* BL21), siendo las condiciones que dieron mayores resultados de inducción de proteína libre en sobrenadante fueron: 30°C, 3 horas de inducción, 0.05 mM de IPTG y 0.5 D.O. Alternativamente se decidió usar la cepa *E. coli* Rosetta pLysS para los posteriores experimentos evaluando de igual forma distintas condiciones obteniendo mejores resultados con 0.05 mM IPTG, 0.3 D.O, 3 horas y 30°C. La proteína de interés debería ser soluble ya que no tenemos indicios de que sea una proteína de membrana, tampoco sospechamos que sea tóxica y las pruebas de inducción con células Rosetta pLysS han permitido obtener mejores resultados. Dentro de las condiciones evaluadas, se intentó reducir la inducción con la idea de ralentizar la expresión de la proteína, dándole tiempo a la proteína para plegarse correctamente y disminuir con ello estas estructuras.

CONCLUSIONES

- La proteína LibR está constituida por 10 alfa hélices y 5 beta plegadas, en cuyo dominio REC se conservan tres ácidos aspárticos que son sitios potenciales de fosforilación en la posición 8, 9 y 54, mientras que en el dominio HTH se conserva la K182 que probablemente se une al DNA. La proteína con mayor homología en la plataforma STRING es FlcA con un 67% y ésta sugiere interacciones en su mayoría con cinasas.
- La proteína MibR tiene 6 alfa hélices y 2 beta plegadas con el dominio característico de hélice giro hélice alado de la familia MarR, y los residuos de unión a DNA como P107 y N106 están conservados en su secuencia. Se sugieren numerosas interacciones con proteína con actividad enzimática, pero ninguna de ella que participen en la biosíntesis del AIA.
- No hay datos que sugieran su función como heterodímeros, lo que sugiere que el efecto en la síntesis de AIA es a través de un mecanismo diferente a su interacción directa.
- Aún después de la transformación en Rosetta es necesario obtener mayoritariamente a la proteína LibR en el sobrenadante.

PERSPECTIVAS

En el futuro se recomienda continuar con los análisis *in silico* y experimentales ya que queda por investigar la manera en que MibR puede interactuar en el promotor de *ipdC* junto con LibR para complementar el mecanismo de regulación del gen *ipdC*, lo cual se pretende alcanzar con ensayos de retardo electroforético, utilizando las proteínas purificadas.

Para evaluar la posible interacción entre ambas proteínas se podría realizar un doble híbrido en bacteria que permita explorar esta posibilidad.

Se sugiere llevar a cabo otros métodos alternativos para solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, como lo son: la subclonación en el vector pQE30 o la lisis con clorhidrato de guanidina.

REFERENCIAS

- Aguilar-Piedras, J. J., Xiqui-Vásquez, M. L., García-García, S., & Baca, B. E. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 29-37.
- Arreola-Barroso, R., Quintero-Hernández, V., Muñoz-Rojas, J., Gaytán, P., Rivera-Urbalejo, A., Rosete-Enríquez, M., Martínez-Martínez, L., & Juárez-González, V. R. (2022). *SWISS-MODEL* es un generador de modelos estructurales de proteínas cuyas estructuras aún no están depositadas en el PDB.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16413>
- Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience.
- Bez, C., Covaceuszach, S., Bertani, I., Choudhary, K. S., & Venturi, V. (2021). LuxR Solos from Environmental Fluorescent Pseudomonads. *MSphere*, 6(2), e01322-20.
<https://doi.org/10.1128/mSphere.01322-20>
- Bi, J., Gou, Z., Zhou, F., Chen, Y., Gan, J., Liu, J., Wang, H., & Zhang, X. (2018). Acetylation of lysine 182 inhibits the ability of *Mycobacterium tuberculosis* DosR to bind DNA and regulate gene expression during hypoxia. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 108. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0112-3>
- Birck, C., Mourey, L., Gouet, P., Fabry, B., Schumacher, J., Rousseau, P., Kahn, D., & Samama, J. P. (1999). Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure (London, England: 1993)*, 7(12), 1505-1515.
[https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)88341-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)88341-0)
- Chen, J., & Xie, J. (2011). Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(10), 2694-2702. <https://doi.org/10.1002/jcb.23219>
- Cogan, D. P., Baraquet, C., Harwood, C. S., & Nair, S. K. (2018). Structural basis of transcriptional regulation by CouR, a repressor of coumarate catabolism, in *Rhodospseudomonas palustris*. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(30), 11727-11735.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003561>
- Coulson, T. J. D., & Patten, C. L. (2015). The TyrR transcription factor regulates the divergent akr-ipdC operons of *Enterobacter cloacae* UW5. *PloS One*, 10(3), e0121241.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121241>
- de Andrade, F. M., de Assis Pereira, T., Souza, T. P., Guimarães, P. H. S., Martins, A. D., Schwan, R. F., Pasqual, M., & Dória, J. (2019). Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. *Microbiological Research*, 223-225, 120-128.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.04.005>

Engbrecht, J., Heilig, J. s., & Brent, R. (1998). Preparation of Bacterial Plasmid DNA. *Current Protocols in Immunology*, 27(1), 10.3.1-10.3.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1003s27>

Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A., & Maghsoudi, N. (2016). Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 8(1), 16.

Fukami, J., Abrantes, J. L. F., Del Cerro, P., Nogueira, M. A., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Archives of Microbiology*, 200(1), 47-56. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>

Grove, A. (2013). MarR family transcription factors. *Current Biology: CB*, 23(4), R142-143. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.013>

Gualpa, J., Lopez, G., Nievas, S., Coniglio, A., Halliday, N., Cámara, M., & Cassán, F. (2019). *Azospirillum brasilense* Az39, a model rhizobacterium with AHL quorum-quenching capacity. *Journal of Applied Microbiology*, 126(6), 1850-1860. <https://doi.org/10.1111/jam.14269>

Help | SWISS-MODEL. (s. f.). Recuperado 12 de mayo de 2023, de <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>

Hou, X., McMillan, M., Coumans, J. V. F., Poljak, A., Raftery, M. J., & Pereg, L. (2014). Cellular Responses during Morphological Transformation in *Azospirillum brasilense* and Its *flcA* Knockout Mutant. *PLoS ONE*, 9(12), e114435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114435>

Hudaiberdiev, S., Choudhary, K. S., Vera Alvarez, R., Gelencsér, Z., Ligeti, B., Lamba, D., & Pongor, S. (2015). Census of solo LuxR genes in prokaryotic genomes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 20. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00020>

Jair, K. W., Martin, R. G., Rosner, J. L., Fujita, N., Ishihama, A., & Wolf, R. E. (1995). Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7100-7104.

Jijón Moreno, S. (2017). Estudio de la regulación transcripcional del gen *ipdC* que participa en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en cepas de *Azospirillum brasilense*. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/1053>

Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge, England)*, 143(18), 3226-3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>

Liu, W., Li, Y., Bai, X., Wu, H., Bian, L., & Hu, X. (2020). LuxR-Type Regulator AclR1 of *Azorhizobium caulinodans* Regulates Cyclic di-GMP and Numerous Phenotypes in Free-Living and Symbiotic States. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 33(3), 528-538. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-19-0306-R>

Lucke, M., Correa, M. G., & Levy, A. (2020). The Role of Secretion Systems, Effectors, and Secondary Metabolites of Beneficial Rhizobacteria in Interactions With Plants and Microbes. *Frontiers in Plant Science*, 11, 589416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.589416>

Milani, M., Leoni, L., Rampioni, G., Zennaro, E., Ascenzi, P., & Bolognesi, M. (2005). An Active-like Structure in the Unphosphorylated StyR Response Regulator Suggests a Phosphorylation- Dependent Allosteric Activation Mechanism. *Structure*, 13(9), 1289-1297. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.05.014>

Pompeani, A. J., Irgon, J. J., Berger, M. F., Bulyk, M. L., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2008). The *Vibrio harveyi* master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. *Molecular Microbiology*, 70(1), 76-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06389.x>

Praneenararat, T., Palmer, A. G., & Blackwell, H. E. (2012). Chemical methods to interrogate bacterial quorum sensing pathways. *Organic & biomolecular chemistry*, 10(41), 8189-8199. <https://doi.org/10.1039/c2ob26353j>

Ramachandran Plot—An overview | ScienceDirect Topics. (s. f.). Recuperado 12 de mayo de 2023, de <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ramachandran-plot>

Ruanto, P., Chismon, D. L., Hothersall, J., Godfrey, R. E., Lee, D. J., Busby, S. J. W., & Browning, D. F. (2020). Activation by NarL at the *Escherichia coli* ogt promoter. *Biochemical Journal*, 477(15), 2807-2820. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200408>

Singh, V. S., Dubey, A. P., Gupta, A., Singh, S., Singh, B. N., & Tripathi, A. K. (2017). Regulation of a Glycerol-Induced Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase by σ_{54} and a LuxR-Type Regulator in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of Bacteriology*, 199(13), e00035-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00035-17>

Ucea-Herrera, J. I., Quiroz-Velásquez, J. D. C., & Hernández-Mendoza, J. L. (2020). Impacto de *Azospirillum Brasilense*, una Rizobacteria que estimula la producción del Ácido Indol-3-Acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, 37(1), 34-39.

Vadakkan, K., Choudhury, A. A., Gunasekaran, R., Hemapriya, J., & Vijayanand, S. (2018). Quorum sensing intervened bacterial signaling: Pursuit of its cognizance and repression. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 16(2), 239-252. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.001>

Vande Broek, A., Gysegom, P., Ona, O., Hendrickx, N., Prinsen, E., Van Impe, J., & Vanderleyden, J. (2005). Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(4), 311-323. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0311>

Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.

Wilkinson, S. P., & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 51-62.

Wisedchaisri, G., Wu, M., Sherman, D. R., & Hol, W. G. J. (2008). Crystal Structures of the Response Regulator DosR from *Mycobacterium tuberculosis* Suggest a Helix Rearrangement Mechanism for Phosphorylation Activation. *Journal of molecular biology*, 378(1), 227-242. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.029>

Yagi, K., Chujo, T., Nojiri, H., Omori, T., Nishiyama, M., & Yamane, H. (2001). Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* FS. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(5), 1265-1269. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1265>

Yáñez Meza, J. L. (2022). Purificación de la proteína MibR de *A. brasilense* Sp7 y búsqueda de proteínas homólogas. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16876>

Zhou, Y., Wei, W., Wang, X., Xu, L., & Lai, R. (2009). *Azospirillum palatum* sp. Nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55(1), 1-7. <https://doi.org/10.2323/jgam.55.1>