



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBILÓGICAS**



**“Análisis *in silico* y funcional de la proteína
MibR de *Azospirillum brasilense* Sp7:
interacción con la región promotora del
gen *ipdC* y predicción de unión al AIA”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**Maestro en Ciencias Microbiológicas
con opción en: Bioquímica y Genética Microbiana.**

PRESENTA

I.B.T. José Cristian Pérez Gómez.

DIRECTORA DE TESIS

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona.

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2026

Índice

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 El ácido indol-3-acético como molécula señal en la interacción bacteria-planta	10
1.2 Vías de producción de AIA en <i>A. brasilense</i>	10
1.3 Regulación de la biosíntesis del AIA y regulación transcripcional del gen <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i>	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.2 MibR: Regulador transcripcional de la familia MarR	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. HIPÓTESIS	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1 Objetivo general.....	16
6.2 Objetivos específicos	16
7. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	17
8. MATERIALES Y MÉTODOS	18
8.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	18
8.2 Técnicas de biología molecular	18
8.2.1 Extracción de DNA genómico de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	18
8.2.2 Amplificación de la región promotora del gen <i>ipdC</i>	19
8.2.3 Purificación de la región promotora del gen <i>ipdC</i>	20
8.2.4 Expresión de MibR	20
8.2.6 Purificación de la proteína MibR.....	21
8.2.7 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)	22
8.3 Análisis Bioinformáticos	24
9. RESULTADOS	27
9.1 Evaluación experimental de la interacción de MibR y la región promotora del gen <i>ipdC</i>	27
9.1.1 Expresión de la proteína MibR	27
9.1.2 Análisis por Western Blot	29
9.1.3 Purificación y cuantificación de la proteína MibR	30
9.1.4 Amplificación y purificación de la región promotora del gen <i>ipdC</i>	31
9.1.5 Interacción de MibR con la región promotora del gen <i>ipdC</i> (EMSA)	33
9.1.6 Efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre el complejo MibR – <i>ipdC</i>	34

9.2 Análisis estructural y funcional in silico del complejo MibR – <i>ipdC</i> – AIA	35
9.2.1 Predicción estructural del complejo MibR en interacción con la región palindrómica del gen <i>ipdC</i>	35
9.2.2 Análisis de las interacciones residuo–base del complejo MibR – DNA mediante UCSF Chimera	37
9.2.3 Modelado por homología y empalme estructural de MibR	39
9.2.4 Identificación y validación del bolsillo de unión del ácido indol-3-acético (AIA) en MibR mediante UCSF Chimera	40
9.2.5 <i>Docking</i> molecular de MibR con ácido indol-3-acético (AIA)	42
9.2.6 Búsqueda de proteínas homólogas en RAST	44
10. DISCUSIÓN	47
10.1 Interacción de MibR con la región promotora del gen <i>ipdC</i>	47
10.2 Calidad y validez del modelo estructural de MibR	48
10.3 Reconocimiento de la región promotora del gen <i>ipdC</i> por la proteína MibR	48
10.4 Evidencias estructurales del AIA como ligando alostérico de MibR	49
10.5 Modelo funcional de regulación del gen <i>ipdC</i> por la proteína MibR y perspectivas	51
11. CONCLUSIÓN.....	52
12. REFERENCIAS.....	53

Índice de Figuras

Figura 1. Colonización de raíces de rábano por células de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 visualizada por microscopía confocal (CLSM) y reconstrucción 3D.	9
Figura. 2. Modelo de señalización mediada por AIA en bacterias asociadas a plantas.	10
Figura 3. Principales vías de biosíntesis de AIA en bacterias.	11
Figura 4. Análisis <i>in silico</i> en <i>A. brasilense</i> Sp7.	12
Figura 5. Modelo general de regulación negativa tipo MarR y inhibición mediada por ligando.	14
Figura 6. Cepa de <i>E. coli</i> BL21 con el plásmido de expresión pGEX – 4T dando como resultado el plásmido pGEXGST – <i>mibR</i>	27
Figura 7. Corrimiento electroforético de extractos proteicos de <i>E. coli</i> BL21 pGEXGST- <i>mibR</i> y <i>E. coli</i> BL21 pGEX-4TI en SDS–PAGE al 10 %.	28
Figura 8. Análisis por Western Blot.	29
Figura 9. Corrimiento electroforético y cuantificación de la proteína MibR purificada.	30
Figura 10. Corrimiento electroforético de la región promotora <i>ipdC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7.	31
Figura 11. Mapa de la región intergénica de 250 pb entre <i>gltX</i> e <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> Sp7.	32
Figura 12. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) del complejo MibR – <i>ipdC</i>	33
Figura 13. Ensayo EMSA mostrando el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre la unión MibR – <i>ipdC</i>	34
Figura 14. Predicción estructural del complejo MibR – <i>ipdC</i> obtenida con AlphaFold 3.	36
Figura 15. Interacciones específicas entre MibR y la región palindrómica del gen <i>ipdC</i>	38
Figura 16. Comparación estructural entre MibR y MarR73.	39
Figura 17. Bolsillo de unión del ácido indol-3-acético (AIA) en MibR.	41
Figura 18. Acoplamiento molecular de AIA en el bolsillo regulador de MibR	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.	18
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	18
Tabla 3. Proteínas homólogas a MibR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	45

RESUMEN

El ácido indol-3-acético (AIA) es una fitohormona fundamental en la interacción bacteria-planta, desempeñando un papel dual como regulador del crecimiento vegetal y como molécula señal en microorganismos asociados a la rizosfera. En *Azospirillum brasilense*, el gen *ipdC*, que codifica para la enzima indol-piruvato descarboxilasa (PPDC), es clave en la biosíntesis de AIA. Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan su expresión permanecen sin caracterizarse. Estudios previos en el laboratorio Interacción Bacteria-Planta han identificado dos proteínas implicadas en la regulación transcripcional del gen *ipdC*: **LibR** (LuxR-like indole-3-acetic acid biosynthesis Regulator) y **MibR** (MarR-like indole-3-acetic acid biosynthesis Regulator). En el presente trabajo se analizó la interacción de la proteína **MibR** con la región promotora del gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 mediante ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) e inferencias bioinformáticas (modelado estructural, alineamiento de secuencias y *docking* molecular). Los resultados experimentales mostraron la expresión soluble de la proteína híbrida GST-MibR (~43 kDa) y su capacidad de formar complejos macromoleculares con la región promotora de *ipdC*. Los análisis *in silico* permitieron identificar residuos potencialmente involucrados en la interacción con el DNA y con AIA, así como un cambio conformacional sugerido por el *docking* con el AIA, coherente con un modelo de disociación inducida por ligando. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que MibR actúa como regulador negativo cuya afinidad por el DNA disminuye en presencia de AIA, contribuyendo a la despresión transcripcional de *ipdC* y, por ende, a la biosíntesis del AIA.

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid (IAA) is a key phytohormone in bacteria–plant interactions, playing a dual role as a regulator of plant growth and as a signaling molecule in rhizosphere-associated microorganisms. In *Azospirillum brasilense*, the *ipdC* gene, encoding indole-3-pyruvate decarboxylase (IPDC), is essential for IAA biosynthesis; however, the molecular mechanisms controlling its expression remain poorly characterized. Previous studies in the Bacteria–Plant Interaction laboratory identified two proteins involved in transcriptional regulation of *ipdC*: **LibR** (LuxR-like indole-3-acetic acid biosynthesis **R**egulator) and **MibR** (MarR-like indole-3-acetic acid biosynthesis **R**egulator). Here, we investigated the interaction of MibR with the *ipdC* promoter region from *A. brasilense* Sp7 using electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and bioinformatics-based inferences (structural modeling, sequence alignment, and molecular *docking*). Experimental results showed soluble expression of the GST–MibR fusion protein (~43 kDa) and its ability to form macromolecular complexes with the *ipdC* promoter. In silico analyses identified candidate residues potentially involved in DNA and IAA recognition, and docking with IAA suggested a ligand-induced conformational change consistent with a dissociation model. Collectively, these findings support the hypothesis that MibR functions as a negative regulator whose DNA-binding affinity decreases in the presence of IAA, thereby contributing to transcriptional derepression of *ipdC* and, consequently, to IAA biosynthesis.

I. INTRODUCCIÓN

La rizosfera es la zona del suelo que está influenciada por las raíces de las plantas. El microbioma de la rizosfera es esencial para el funcionamiento de la planta al estar implicado en la adquisición de nutrientes del suelo y la protección contra patógenos. La rizosfera contiene numerosos nichos para el crecimiento y la proliferación de una variedad filogenéticamente diversa de microorganismos, incluidas bacterias, arqueas, hongos, protistas, nematodos e incluso virus (Lin et al., 2022). Estos microorganismos son atraídos por los exudados de la raíz de la planta para proliferar en un ambiente rico en carbono (Pantigoso et al., 2022) y son capaces de establecer relaciones de simbiosis, mutualismo o parasitismo con la planta. Los microorganismos que establecen asociaciones mutualistas con su hospedero se clasifican en dos tipos: protectores contra patógenos y proveedores de nutrientes, entre las que destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) (Pantigoso et al., 2022).

El género *Azospirillum* conforma un subgrupo dentro de la familia *Rhodospirillaceae*. Las bacterias del género *Azospirillum* pertenecen a la subclase α de proteobacterias y se caracterizan por ser gramnegativas, con forma vibroide, fijadoras de nitrógeno de vida libre, no formadoras de esporas, además de contener flagelos polares y peritricos. Actualmente se han identificado 27 especies, siendo *A. brasilense* y *A. lipoferum* las más estudiadas. El genoma de *Azospirillum* spp. contienen de 6 a 7 replicones y su tamaño varía entre 6.4-7.6 megapares de bases dependiendo de la especie o cepa, con un contenido de G+C del 64 al 71 % (Chapter 6 - *Azospirillum*, 2020). Estas bacterias están presentes en una gran diversidad de ecosistemas y varias especies tienen una gran importancia agronómica debido a su capacidad para mejorar el crecimiento y la productividad vegetal (Figura I). Esta estimulación se debe a varios mecanismos, entre los cuales destaca la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA). El AIA es una auxina indispensable en las plantas ya que participa en diversos procesos biológicos como crecimiento, desarrollo, defensa contra patógenos, etc. Además, el AIA tiene un rol clave en la regulación de la fisiología bacteriana, adaptaciones a estrés y la comunicación microorganismo-microorganismo (Duca et al., 2020).

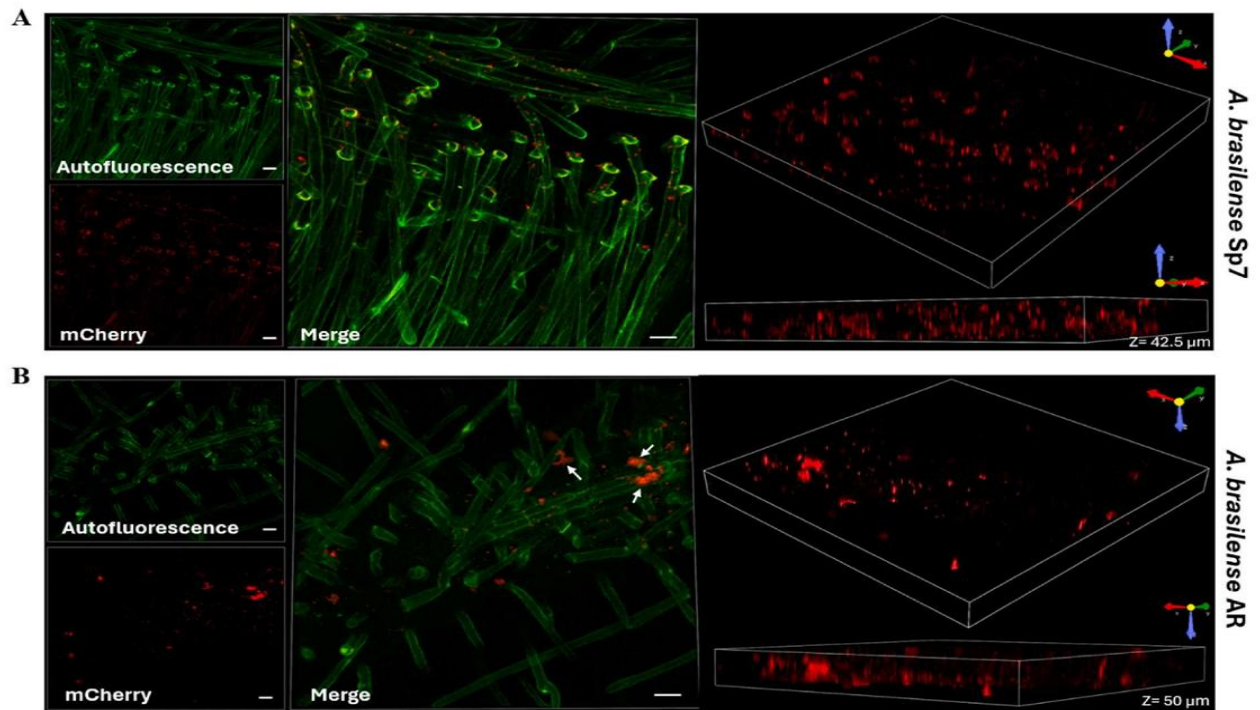


Figura I. Colonización de raíces de rábano por células de *Azospirillum brasilense* Sp7 visualizada por microscopía confocal (CLSM) y reconstrucción 3D.

Imágenes representativas a 7 días postinoculación: (A) cepa silvestre *A. brasilense* Sp7 (WT; portando pMP2449-5) y (B) mutante AR, correspondiente al mutante *cysK-A* (*A. brasilense* AR; portando pMP2449-5). En cada condición, los paneles de la izquierda muestran la autofluorescencia del tejido vegetal (verde), la señal bacteriana marcada con mCherry (rojo) y la imagen fusionada (Merge). Los recuadros de la derecha presentan la reconstrucción tridimensional del apilamiento Z (Z-stack) del canal mCherry y una sección ortogonal (plano de corte) a lo largo del eje Z para visualizar la distribución bacteriana en profundidad. En comparación con WT, el mutante AR exhibe agregados más gruesos y densos (flechas blancas), consistentes con rasgos asociados a un estilo de vida sésil (floculación/biofilm). La mutante *cysK-A* (AR) se generó para evaluar el papel de CysK-A (cisteína sintasa A) en dichos rasgos, relevantes para la adhesión y permanencia en la rizósfera. Tomado de Herrera-Galindo et al. (2025)

1.1 El ácido indol-3-acético como molécula señal en la interacción bacteria-planta

El AIA ($C_{10}H_9NO_2$) es un ácido débil que posee una estructura similar al triptófano. Cuenta con un anillo indol y una función de ácido carboxílico (Paque et al., 2016).

El AIA regula procesos biológicos específicos en las plantas, incluyendo el fototropismo y el gravitropismo de raíces y brotes, la diferenciación del tejido vascular, la dominancia apical, la iniciación de raíces laterales y adventicias, la estimulación de la división celular y la elongación de tallos y raíces (Glick, 2020). Además, el AIA promueve la distensión de las paredes celulares de las raíces de las plantas, lo cual incrementa significativamente la exudación radicular. Este proceso modula, a su vez, la diversidad y la actividad de las bacterias que se encuentran en la rizosfera (Glick, 2020).

El AIA es sintetizado por diversos microorganismos, incluyendo hongos y bacterias perteneciente al grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Las rutas metabólicas a través de las cuales se sintetiza el AIA en bacterias suelen ser redundantes, incluso en un solo organismo (Duca et al., 2018). Esta fitohormona juega un papel muy importante en la regulación de funciones fisiológicas microbianas tales como la modulación del crecimiento (efectos promotores o inhibidores), la adaptación a diversas condiciones de estrés, el incremento en la producción de lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS) y biopelícula. Además, participa como una molécula de señalización en la interacción entre microorganismos y plantas (Tang et al., 2023). En este sentido, el AIA actúa como molécula señal en rizobacterias, regulando la expresión de genes que participan en su catabolismo y síntesis (Donati et al. 2013) (Figura 2). Particularmente en *A. brasilense* Sp7, el AIA regula la expresión del gen *ipdC* (Malhotra et al., 2008).

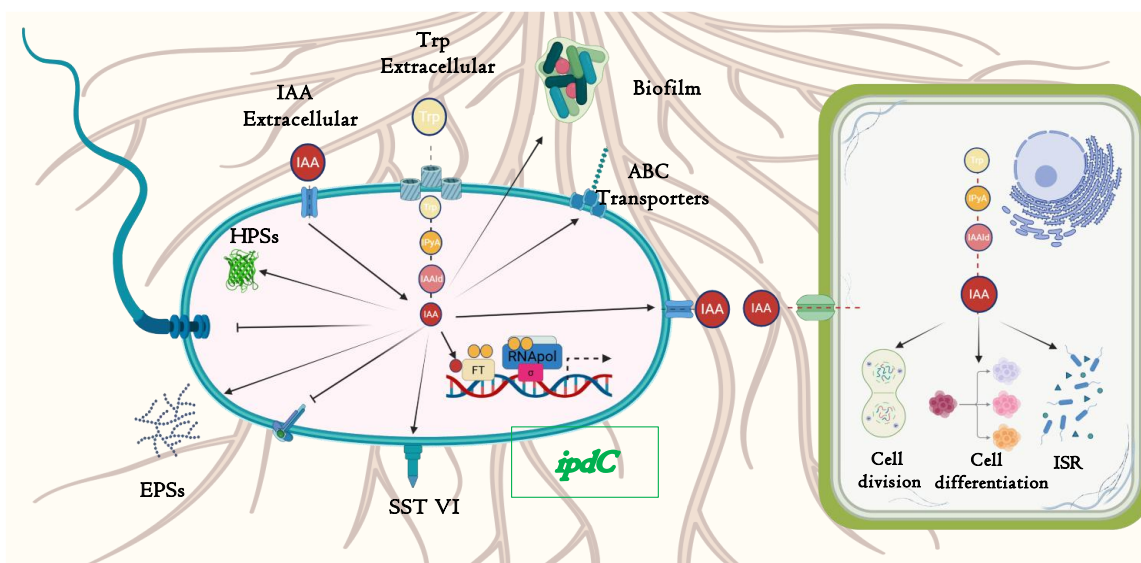


Figura. 2. Modelo de señalización mediada por AIA en bacterias asociadas a plantas.

En la rizósfera, el triptófano es captado por bacterias asociadas a la planta y convertido en AIA, por ejemplo, mediante la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA). Dentro de la célula, el AIA funciona como señal molecular que regula la expresión de genes relacionados con formación de biopelícula, síntesis de exopolisacáridos y del sistema de secreción tipo VI (SSTVI), transportadores ABC, etc. Además, reprime genes involucrados en el ensamblaje del flagelo y proteínas MCPs. Finalmente, el AIA excretado al medio puede ser absorbido por la planta, actuando como molécula señal para activar procesos como la división, la diferenciación celular, así como la respuesta sistémica inducida (ISR). Modificado de Jijón (Puyvelde et al., 2011; Donati et al., 2013).

La cantidad de AIA producido por PGPRs depende de varios factores, incluyendo la especie, la cepa bacteriana, las condiciones de cultivo, la concentración de triptófano, el pH, la oxigenación y la fase de crecimiento (Jijón-Moreno, 2017). La biosíntesis del AIA en bacterias se clasifica en vías metabólicas dependientes de triptófano y vías independientes de este aminoácido precursor. El L-triptófano, es el precursor clave para la biosíntesis de AIA; se trata de un aminoácido relativamente poco común y el más denso en energía de todos los aminoácidos (Duca et al., 2020). El costo energético para la biosíntesis de AIA en las células bacterianas es alto, por lo que los niveles intracelulares de triptófano suelen ser bajos. Los niveles altos de AIA solo se producen cuando se suministran grandes cantidades de triptófano de manera exógena (Patten et al., 2013). En el género *Azospirillum* se han identificado cuatro vías metabólicas dependientes del triptófano para la producción de AIA; vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), vía de la indol-3-acetamida (IAM), vía del indol-acetonitrilo (IAN) y la vía de la triptamina (TAM), además de una vía independiente de triptófano (Figura 3) (Carreño-Lopez et al., 2000).

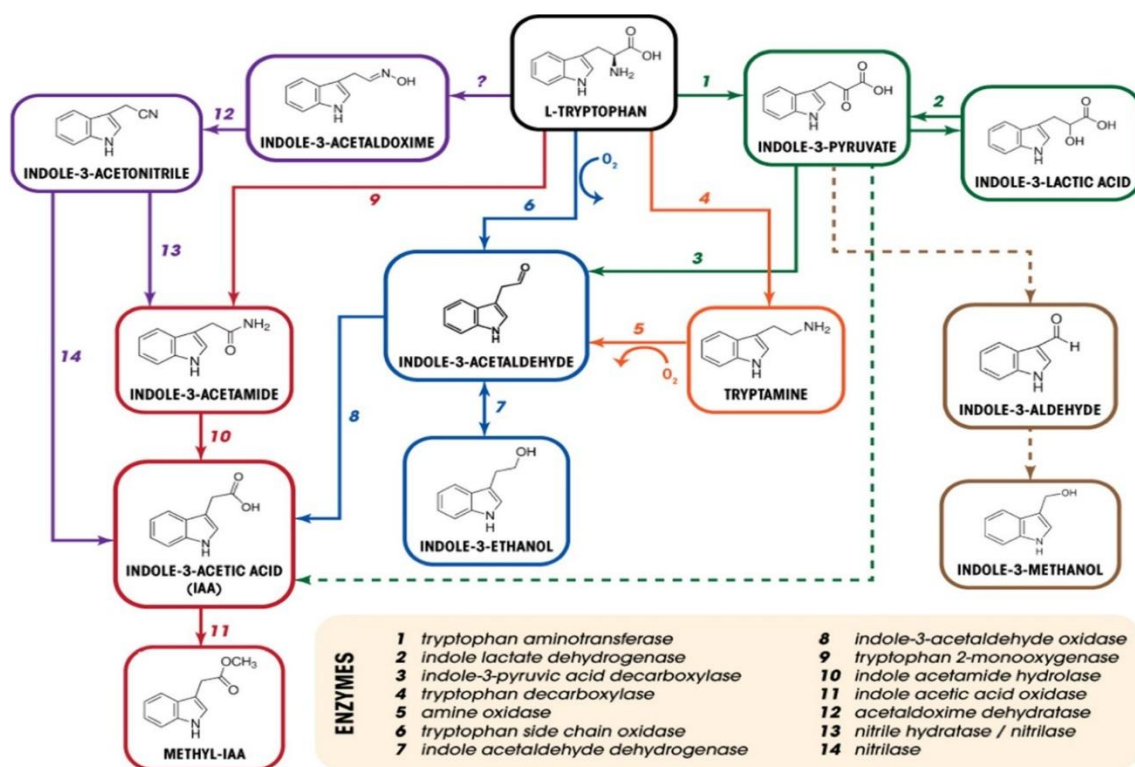


Figura 3. Principales vías de biosíntesis de AIA en bacterias.

Las líneas punteadas indican las reacciones en las que no se han identificado las enzimas implicadas. En *A. brasilense* Sp7, la principal ruta de biosíntesis es la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA). En esta ruta, el L-triptófano es convertido primero en IPyA por una triptófano aminotransferasa. Posteriormente, una indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC) transforma el IPyA en indol-3-acetaldehído (IAAld). Finalmente, el IAAld es oxidado por deshidrogenasas/oxidases específicas para formar ácido indol-3-acético (AIA) (Duca et al., 2020).

I.3 Regulación de la biosíntesis del AIA y regulación transcripcional del gen *ipdC* en *A. brasilense*

La biosíntesis del AIA está regulada por diversos factores ambientales que influyen en la expresión del gen *ipdC*, que codifica para la enzima fenil piruvato descarboxilasa (PPDC). Por ejemplo, el pH ácido y las condiciones anaeróbicas incrementan la expresión de *ipdC* en *A. baldaniorum* Sp245. En *A. brasilense* Sp7 la expresión de *ipdC* se ve potenciada por el aumento de la densidad celular, alcanzando su estado máximo en la fase estacionaria; hecho que coincide con la acumulación de AIA en el medio. Además, se ha demostrado que la expresión de este también incrementa al adicionar AIA exógeno al medio de cultivo (Donati, Lee, Leveau, & Chang, 2013). La enzima PPDC es considerada una de las más importantes en la biosíntesis del AIA, dado que la mutación de *ipdC* en *A. brasilense* afecta drásticamente la biosíntesis de AIA (Molina et al. 2018).

Estudios *in silico* de *A. brasilense* Sp7 mostraron que el gen *ipdC* está localizado en la cadena positiva del cromosoma anotado como OH82_RS25480. A una distancia de 250 pb río arriba y codificado en dirección opuesta a *ipdC* se encuentra el gen *gltX*, que codifica para una glutamato tRNA ligasa y a 205 pb río abajo, el gen OH82_RS25475 que codifica para una probable proteasa dependiente de ATP (Reyes-Carmona et al., 2025). Entre los genes *gltX* e *ipdC* se encuentra una región intergénica de 250 pb, la cual presenta distintos elementos en *cis* donde se observa un probable sitio de unión a σ^{54} , una secuencia denominada “elemento de respuesta a auxinas” (AuxRE) y, finalmente, una secuencia palindrómica de 20 nucleótidos que probablemente funciona como un sitio de unión de elementos en *trans* que pudieran intervenir en la regulación de *ipdC* (Figura 4) (Malhotra et al., 2008; Reyes-Carmona et al., 2025).

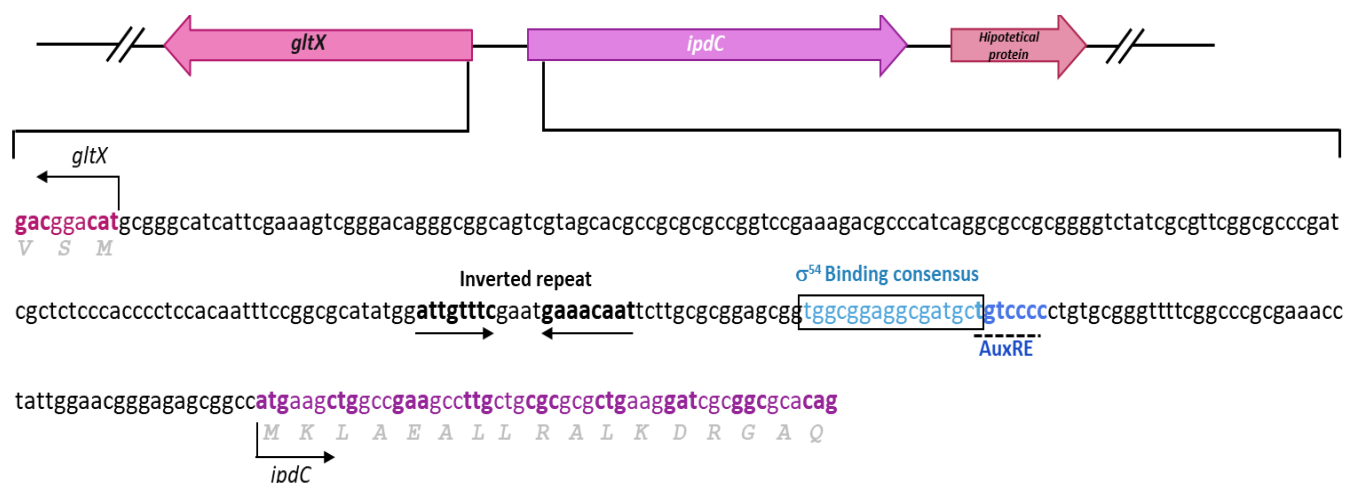


Figura 4. Análisis *in silico* en *A. brasilense* Sp7.

El gen *ipdC* (fenil piruvato descarboxilasa) se encuentra flanqueado por *gltX* (glutamato - tRNA ligasa) y por un gen que codifica una probable proteasa dependiente de ATP. Entre *gltX* e *ipdC* se encuentra una región intergénica de ~250 pb que contiene un posible sitio σ^{54} , un elemento AuxRE y una secuencia palindrómica de 20 pb río arriba del gen *ipdC*.

2. ANTECEDENTES

En el laboratorio de la interacción bacteria-planta, se estudió la participación de la proteína TyrR en la regulación transcripcional del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7. Sin embargo, la mutación del gen *tyrR* no tuvo ningún efecto significativo en la expresión del gen *ipdC*. Debido a este hecho, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con el fin de identificar proteínas de unión al promotor de *ipdC* a través de cromatografía de afinidad a DNA seguido de espectrometría de masas. A través de esta estrategia se identificaron cuatro proteínas de *A. brasilense* Sp7 que se unieron a la sonda de DNA (promotor de *ipdC*), mismas que, de acuerdo con el corrimiento electroforético, mostraron los siguientes tamaños: 155.3, 75.8, 23.5 y 18.2 kDa. De acuerdo con el análisis por MALDI-TOF, estas fueron identificadas como: la subunidad β de la RNA polimerasa, una poliribonucleótido nucleotidiltransferasa y reguladores transcripcionales de las familias LuxR y MarR. Estas últimas fueron nombradas como **LibR** (LuxR-like **i**ndole-3-acetic acid **b**iosynthesis **R**egulator) y **MibR** (**M**arR-like **i**ndole-3-acetic acid **b**iosynthesis **R**egulator), (Reyes-Carmona et al., 2025).

Para ampliar la información sobre la posible participación de estas proteínas en la regulación del gen *ipdC*, así como en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* Sp7, se construyeron mutantes de los genes *libR* (denominada como *A. brasilense* 2113) y *mibR* (*A. brasilense* 2114), mediante la inserción de un casete de resistencia a kanamicina (Km) en el ORF de *libR* y de gentamicina (Gm) en el ORF de *mibR*. Así mismo, se realizó una doble mutante en ambos genes nombrada (*A. brasilense* 2115). 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% (Reyes-Carmona et al., 2025). Estos resultados sugieren la participación de ambas proteínas en la biosíntesis de AIA. Además, la mutación de *libR* y *mibR* tuvo un efecto negativo en la expresión del gen *ipdC*. Este efecto fue incluso mayor en la doble mutante *libR-mibR*, lo cual apoya la idea de la participación de ambas proteínas en la regulación transcripcional de *ipdC*. La existencia de una repetición palindrómica presente en la región intergénica entre *gltX* e *ipdC*, sugiere la participación de proteínas de unión a DNA en la regulación transcripcional del gen. Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado si LibR y/o MibR se unen a dicho elemento en *cis*. Jijón Moreno (2017), propuso un modelo hipotético para describir la regulación mediada por las proteínas MibR y LibR. Este modelo sugiere que, durante la fase exponencial del crecimiento de *A. brasilense* Sp7, MibR se encuentra unida al promotor. El AIA sintetizado tanto en la fase exponencial tardía como en la estacionaria, actúa como un ligando de unión a MibR, provocando un cambio conformacional de la proteína y su posterior disociación del promotor de *ipdC*. Esto permite la unión de la proteína LibR en un estado fosforilado, la cual, probablemente al interactuar con el factor σ^{54} , activa la expresión de *ipdC* en la fase estacionaria de crecimiento (Jijón-Moreno, 2017).

2.2 MibR: Regulador transcripcional de la familia MarR

La proteína MibR se clasifica dentro de la familia de reguladores transcripcionales tipo MarR, ya que presenta un dominio de unión a DNA del tipo winged helix–turn–helix (wHTH) característico de estos reguladores. Los factores de transcripción MarR reconocen secuencias específicas en los promotores de sus genes diana, generalmente motivos palindrómicos de ~16–20 pb (Will et al., 2020), y modulan la transcripción en función de la percepción de señales ambientales o fisiológicas, actuando con mayor frecuencia como represores, aunque también se han descrito activadores y reguladores con función dual (represión/activación) (Nazaret et al., 2023). A pesar de que las secuencias de la familia MarR muestran en general baja identidad entre linajes (habitualmente <30 %), muestran una estructura terciaria similar, con capacidad para reconocer una amplia diversidad de promotores y responder a numerosas moléculas señal. En términos mecanísticos, la actividad de unión al DNA de estos reguladores suele estar controlada por modulación alostérica: ligandos específicos —incluyendo compuestos aromáticos, intermediarios metabólicos o iones metálicos— se unen a un bolsillo localizado en la interfaz entre la región de dimerización y el dominio de unión al DNA, induciendo cambios conformacionales que alteran la orientación y/o separación de los motivos wHTH y, en muchos casos, disminuyen su afinidad por el DNA (Baksh et al., 2020) (Figura 5). En bacterias que interactúan con plantas, los reguladores tipo MarR participan en la regulación de procesos clave como la degradación de compuestos aromáticos en la rizosfera, la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS), la respuesta a estrés oxidativo y la virulencia de fitopatógenos, integrando señales derivadas del hospedero y del ambiente del suelo en redes reguladoras que ajustan la expresión génica a las condiciones de la rizosfera (Nazaret et al., 2023).

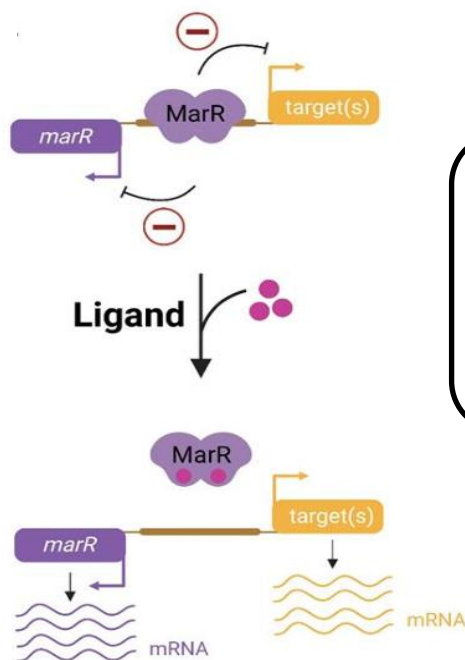


Figura 5. Modelo general de regulación negativa tipo MarR y inhibición mediada por ligando.

En ausencia de ligando, un regulador MarR se une al promotor y reprime la transcripción de sus genes diana. La unión de un ligando pequeño al sitio alostérico desestabiliza el complejo MarR – DNA y permite la expresión de los genes regulados. Tomado de Nazaret et al. (2023).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un estudio previo se identificaron dos proteínas que se unen a la región promotora del gen *ipdC* que, participan en la biosíntesis de AIA, denominadas LibR y MibR. Mutantes de *A. brasilense* carentes de estas proteínas mostraron bajos niveles de expresión de *ipdC* comparadas con la cepa silvestre, así como una afectación en la biosíntesis de AIA. La existencia de una repetición palindrómica presente en la región promotora de *ipdC*, sugiere la participación de proteínas de unión a DNA en la regulación transcripcional del gen. Sin embargo, hasta el momento no se ha investigado si LibR y/o MibR se unen a dicho elemento en *cis*. La mayoría de los miembros de la familia MarR actúan como reguladores negativos, los cuales requieren de la unión a un ligando para disociarse del DNA. En este sentido, resulta interesante investigar si el AIA actúa como un ligando de MibR, lo que permitirá profundizar en los mecanismos de regulación transcripcional del gen *ipdC* en *Azospirillum*.

4. JUSTIFICACIÓN

Azospirillum ha sido objeto de múltiples estudios por sus variadas implicaciones biotecnológicas, principalmente en su papel en la mejora del rendimiento vegetal. Su aplicación puede contribuir a la resolución de problemas de desabasto alimentario y de nutrición en países en vías de desarrollo. LibR y MibR son reguladores transcripcionales de las familias LuxR y MarR, respectivamente, implicadas en la expresión del gen *ipdC*, el cual codifica para la proteína indol piruvato descarboxilasa, considerada una enzima clave en la biosíntesis del AIA, una fitohormona implicada en diversos procesos del desarrollo vegetal, así como una molécula señal en el proceso de interacción bacteria-planta. La biosíntesis de AIA es uno de los mecanismos más importantes por los cuales las PGPRs estimulan el desarrollo en las plantas. Los resultados derivados de este trabajo permitirán profundizar en el mecanismo de acción de MibR. En este sentido, se investigará si esta proteína se une a la región promotora del gen *ipdC* y si el AIA actúa como un ligando que, al unirse a MibR, modula su función como un regulador transcripcional. Aunado a ello, se aportará información sobre el mecanismo de acción del primer regulador transcripcional de la familia MarR identificado en el género *Azospirillum*.

5. HIPÓTESIS

- La proteína MibR se une a la región promotora del gen *ipdC* en ausencia de AIA mientras que en presencia de esta fitohormona se provoca su disociación del DNA.

6. OBJETIVOS

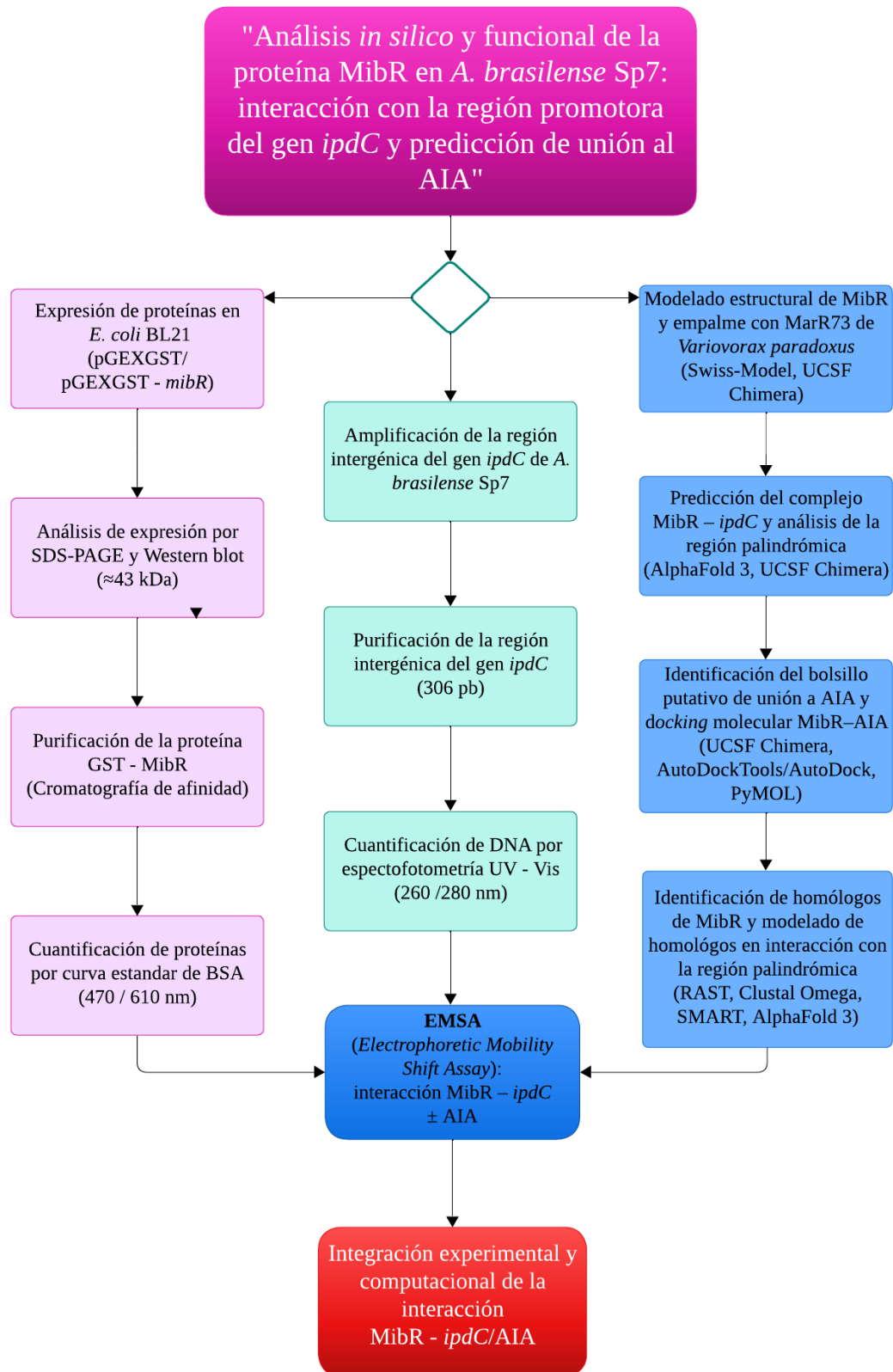
6.1 Objetivo general

- Investigar la interacción de la proteína MibR con la región promotora del gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la unión de la proteína MibR a la región promotora del gen *ipdC*, en presencia y ausencia de ácido indol-3-acético.
2. Analizar *in silico* la interacción de la proteína MibR a la región promotora del gen *ipdC*.
3. Realizar un *docking* molecular entre la proteína MibR y la molécula de ácido indol-3-acético.

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas y los plásmidos utilizados en este trabajo están listados en la tabla I. Las cepas de *E. coli* BL21 se cultivaron a 30 °C en medio LB (peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) con ampicilina (Ap) a una concentración de 100 ug/mL. Las cepas de *A. brasilense* Sp7 se cultivaron en medio nutritivo Difco (medio D, líquido) (Medio Difco 8.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, KCl 1.0 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.01 g/L) a 30 °C.

Tabla I. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

<i>Cepas o plásmido</i>	<i>Características</i>	<i>Referencia</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>rB⁻</i> , <i>mB⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>A. brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre	(Tarrand et al., 1978)
<i>Plásmidos</i>		
pGEX-4TI	Plásmido de expresión de proteínas el cual contiene el gen que codifica para la GST. (Ap ^R)	GE Healthcare Life Sciences
pGEXGST- <i>mibR</i>	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)	(Jijón Moreno, 2017)

8.2 Técnicas de biología molecular

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

<i>Oligonucleótidos</i>			
<i>Uso</i>	<i>Secuencia 5' – 3'</i>	<i>Amplicón</i>	<i>Referencia</i>
rRNA-AZOF rRNA-AZOR	TGAGAAGGGATGCGCAGGCGG CCGTGAGAAGGGATGCGCCG	Gen rRNA 16S de <i>Azospirillum</i> spp. (1.75 kb)	(Jijón-Moreno et al., 2015)
BIOT-PipdCF PipdCR	CATGCGGGCATCATTCGAAAGTC TGTGCGCCGCGATCCTTCAG	Promotor de <i>ipdC</i> de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 (303 pb)	(Reyes-Carmona, et al., 2025)

8.2.1 Extracción de DNA genómico de *A. brasilense* Sp7

Para la obtención de DNA genómico, se seleccionaron tres colonias (UFCs) de *A. brasilense* Sp7 obtenidas en placa y se inocularon por separado en tubos con 5 mL de medio nutritivo Difco (medio D, líquido) y se incubaron durante 18 h a 30 °C en agitación constante a 150 r.p.m. Posteriormente, el cultivo se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante un minuto a temperatura ambiente. El medio de cultivo se eliminó por decantación hasta conservar únicamente el paquete celular, el cual se resuspendió en 500 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM de EDTA). A continuación,

se agregaron SDS (20%; 40 μ L), NaCl (3 M; 100 μ L) y CTAB (10%; 80 μ L); la mezcla se homogeneizó por inversión durante 2 min y se incubó 10 min a 37 °C.

Después de la incubación, se adicionaron 150 μ L de fenol y 400 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por 2 min, seguido de centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se realizó un lavado con 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se centrifugó 5 min a 10,000 r.p.m. y la fase acuosa se transfirió nuevamente a un tubo nuevo. Este paso se repitió hasta que la interfase quedó libre de restos celulares.

Para la precipitación del DNA, se agregaron 1.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó 15 min a 10,000 r.p.m. a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó dos veces con 1 mL de etanol (70%), mezclando por inversión y centrifugando 10 min a 10,000 r.p.m. en frío en cada lavado. El sobrenadante se retiró primero por decantación y posteriormente con ayuda de palillos de madera estériles. El tubo se colocó en un termoblock a 37 °C durante 5 min hasta evaporar completamente los restos de etanol. Finalmente, el DNA se resuspendió en 50 μ L de buffer TE con RNasa (100 μ g/mL) y se incubó a 37 °C durante 1 h.

8.2.2 Amplificación de la región promotora del gen *ipdC*

Para la amplificación por PCR se prepararon mezclas de reacción por duplicado con un volumen final de 40 μ L, la cual incluía los siguientes componentes: mezcla maestra para PCR (2X) (Thermo Scientific DreamTaq Green (1.0 U de ADN polimerasa DreamTaq, 2 mM de MgCl₂ y 0.2 mM de dNTPs), 0.5 μ L H₂O libre de nucleasas, 4 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) (10% (v/v final), 4 μ L de oligonucleótido reverso (PipdCR; 2.0 μ M), 4 μ L de oligonucleótido delantero (BIOT-PipdCF; 2.0 μ M). Para descartar contaminación, se incluyó un control negativo (CN), en el cual el volumen correspondiente al DNA genómico se sustituyó por agua libre de nucleasas. Se utilizó DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 como molde agregando 75 ng de DNA por reacción. Se centrifugaron brevemente las muestras y se realizó una PCR touchdown con el siguiente programa térmico:

Ciclo I (1x)
Etapa 1: 95 °C x 5: 00 min
Ciclo 2 (12x)
Etapa 1: 95 °C x 30: 00 s
Etapa 2: 70 °C x 1: 00 min.
Se disminuyó la temperatura después del ciclo 1, 0.5 °C en cada ciclo.
Etapa 3: 72 °C x 1:00 min/kb.
Ciclo 3 (22x)
Etapa 1: 95 °C x 30: 00 s
Etapa 2: 60 °C x 1: 00 min.
Etapa 3: 72 °C x 1:00 min/kb.
Ciclo 4 (1x)
Etapa 1: 72 °C x 5: 00 min.
Ciclo 5 (1x)
Etapa 1: 4 °C ∞

La integridad de las muestras se visualizó en geles de agarosa al 1%. Los geles se trataron con bromuro de etidio durante 15 min, se lavaron con H₂O tridestilada durante 5 min y se fotografiaron bajo luz ultravioleta para visualizar las bandas de DNA.

8.2.3 Purificación de la región promotora del gen *ipdC*

Para la purificación del DNA correspondiente a la región promotora de *ipdC*, se tomó una alícuota de 30 µL de la muestra amplificada por PCR que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se mezcló con 70 µL de H₂O libre de nucleasas, un volumen de isopropanol, 20 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.3 y 10 µL de glucógeno (Thermo scientific, 20mg/mL). El DNA se dejó precipitar a -20 °C (toda la noche). La mezcla se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó por decantación y el pellet se lavó con etanol al 70%. La mezcla se centrifugó nuevamente a 10,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. El proceso de lavado con etanol se repitió 3 veces. Después de eliminar el sobrenadante, se eliminó el resto de etanol con ayuda de palillos de madera estériles y la muestra se dejó secar en un termoblock a 37°C durante 5 min. Finalmente, el pellet se resuspendió en 20 µL de H₂O libre de nucleasas.

La región promotora purificada fue cuantificada por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda a 260 / 280 nm.

8.2.4 Expresión de MibR

Se preparó un precultivo bacteriano a partir de *E. coli* BL21-*mibR*. Para ello, se seleccionaron tres colonias (UFCs) obtenidas en placa y se inocularon por separado en tubos con 5 mL de medio LB complementado con ampicilina (100 µg/mL). Los cultivos se incubaron a 30 °C y 150 r.p.m. durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:100 de cada precultivo y se inoculó en matraces con 25 mL de medio LB complementado con ampicilina (100 µg/mL). Los matraces se incubaron a 30 °C y 150 r.p.m. hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0.5–0.6.

Para la expresión de proteínas, los cultivos se indujeron con isopropil-β-D-I-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM. Como control positivo, se preparó un cultivo de *E. coli* que expresa la proteína GST (glutación-S-transferasa). Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (25 mL) a 10,000 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente. Los pellets se almacenaron a -20 °C durante toda la noche y, posteriormente, se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl pH 8.0, 75 mM; EDTA pH 8.0, 5 mM; glicerol 0.5% v/v; β-mercaptoetanol 0.1% v/v; lisozima 0.1 mg/mL; PMSF 0.0015%). Las células se lisaron por sonicación en tres ciclos a 40% de amplitud, a 4 °C, durante 1 min. Las muestras lisadas se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C; el sobrenadante (SN) se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo.

Para evaluar la inducción, tanto los pellets como los sobrenadantes (SN) se resuspendieron en buffer de carga Laemmli 4X para SDS-PAGE (250 mM Tris-HCl pH 6.8; SDS 8% p/v; glicerol 40% v/v; azul de bromofenol 0.02% p/v; β-mercaptoetanol 20% v/v) y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente 4–10% (Bio-Rad), utilizando buffer de corrida SDS-PAGE IX (Tris base 25 mM, glicina 200 mM y SDS 0.1% p/v). Finalmente, el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-

250 (0.25% p/v en 45% metanol y 10% ácido acético, v/v) y se destiñó con una solución de metanol 20% y ácido acético 15% (v/v).

8.2.5 Identificación de la proteína MibR

Para confirmar la presencia de MibR en el extracto proteico, se realizó un análisis por Western blot. En primera instancia, se corrió un gel SDS–PAGE con el sobrenadante (SN). Posteriormente, se preparó el buffer de transferencia (Tris base 4.5 g, glicina 21.6 g, 300 mL de metanol y 1200 mL de H₂O tridestilada). Previo a la transferencia, las almohadillas Scotch-Brite, el papel Whatman 3MM y la membrana se sumergieron durante 30 min en buffer de transferencia. La membrana de PVDF se cortó al tamaño del gel utilizando guantes para evitar contaminación, y el gel SDS–PAGE con las muestras proteicas se equilibró durante 15–20 min en el mismo buffer.

Para el armado del “sándwich” de transferencia, sobre un vidrio se colocó papel filtro, el gel, la membrana de PVDF y otro papel filtro (en ese orden) y se ensambló el casete con las almohadillas Scotch-Brite. El casete se colocó en la cámara de transferencia y se añadió el buffer Tris/glicina/metanol al 1%. La transferencia se realizó a 100 V/190 mA durante 1 h 20 min. Al finalizar, se abrió el casete para verificar que la transferencia de proteínas se hubiera llevado a cabo correctamente.

La membrana se incubó con una solución de bloqueo (20 mL de PBS IX con Tween 0.05% y 5% de leche descremada en polvo) y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, la solución de bloqueo se reemplazó por solución de bloqueo complementada con el anticuerpo primario anti-GST [1:3000] (Thermo Fisher, *GST Tag polyclonal antibody* #CAB4169) y se incubó durante 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó cinco veces con PBS IX/Tween 0.05% (5 min cada lavado, con agitación constante). A continuación, se añadió el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG (H+L) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) [1:5000] (Promega, No. Cat. W4011) y se incubó durante una h, seguido de cinco lavados bajo las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, la detección se realizó mediante un método cromogénico utilizando el sistema diaminobencidina (DAB) - H₂O₂, en PBS IX de acuerdo con técnicas estandarizadas del laboratorio.

8.2.6 Purificación de la proteína MibR

Se realizó una cromatografía de afinidad para la obtención de la proteína MibR – GST purificada, utilizando solo SNs obtenidos de la inducción de las proteínas. Se tomaron de 200 µL de perlas magnéticas con afinidad a GST, las cuales se homogeneizaron en un rotador durante 5 min y se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 3 min. Se retiró el buffer donde se mantenían suspendidas las perlas y se equilibraron con 1.5 mL de buffer PBS IX. (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM; pH 7.1).

El proceso de rotación y centrifugación se realizó dos veces en total. Después se retiró el sobrenadante y las perlas se resuspendieron en 200 µL de PBS IX. Las perlas resuspendidas en PBS IX. se mezclaron con el extracto proteico y se mantuvieron en rotación durante 1 h a 4°C. Se procedió a centrifugar nuevamente bajo las condiciones descritas arriba. El SN (el extracto no unido) se separó de las perlas y posteriormente estas fueron sometidas a 5 rondas de lavados con buffer PBS IX. para eliminar todas las proteínas de unión inespecífica. Para la elución de la proteína unida a las perlas se realizaron seis eluciones secuenciales con buffer de elución (50 mM Tris – HCl pH 8.0 y 10 mM de L – glutatión reducido). Se utilizó un volumen de 100

μL en la primera elución (E1) y 75 μL en cada una de las cinco eluciones subsecuentes (E2–E6), para un volumen total de 475 μL de buffer de elución aplicado por muestra. Las perlas fueron centrifugadas bajo las condiciones descritas anteriormente. El L – glutatión reducido tiene una mayor afinidad por el sitio de unión a las perlas, liberando a la proteína MibR con el tag de GST en el SN. Finalmente, las proteínas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para la cuantificación de proteínas (μg) se realizó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA; 0–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mediante un ensayo basado en Coomassie Brilliant Blue G-250, cuantificado por espectrofotometría UV–Vis a una longitud de onda a 470 / 610 nm, siguiendo el método descrito por Grintzalis et al. (2015).

8.2.7 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Para analizar la interacción de MibR con la región promotora de *ipdC*, se realizaron ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) utilizando proteína MibR purificada por cromatografía de afinidad. Se preparó un gel PAGE nativo al 6%, el cual se pre-corrió en una cámara de electroforesis durante 1 h 30 min a 4°C en buffer TBE 0.5X. (Tris base 44.6 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) con el fin de eliminar contaminantes que pudieran interferir en el corrimiento.

Se emplearon concentraciones ascendentes de proteína MibR (70 nM, 110 nM, 275 nM y 315 nM), las cuales se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de buffer de unión (Tris 80 mM pH 8.0, MgCl_2 12 mM, EDTA 0.4 mM, DTT 0.4 mM y HEPES 25 mM). El volumen de buffer de unión se ajustó de forma descendente, en proporción al volumen de proteína empleado, para mantener constante el volumen final de reacción. Posteriormente, cada mezcla proteica se resuspendió suavemente y se adicionaron 200 ng de la sonda de DNA correspondiente al promotor de *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp7, incubándose por 30 min a temperatura ambiente.

Previo al corrimiento electroforético, las muestras se mezclaron suavemente con buffer de carga nativo 2.5X. (TBE 2X., glicerol 40% v/v, azul de bromofenol 0.08% p/v) y se cargaron inmediatamente en el gel. La electroforesis se realizó a 60 V durante 3 h a 4°C . Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 20 min, se lavó con H_2O tridestilada por 5 min y se fotografió bajo luz ultravioleta para la visualización de las bandas correspondientes a los complejos DNA–proteína.

Efecto del AIA en la interacción MibR--*ipdC*.

Para evaluar el posible efecto del AIA sobre la interacción entre la proteína MibR y la región promotora del gen *ipdC*, se realizaron ensayos de EMSA bajo condiciones similares a las descritas previamente. Se empleó la concentración más alta de proteína obtenida hasta ese momento (325 nM) con el fin de observar nuevamente el retardo en la movilidad y analizar el efecto del AIA sobre la unión de MibR al DNA, utilizando 200 ng de la región promotora del gen *ipdC* como sonda. Para ello, se preparó un stock de AIA a 100 mg/mL disuelto en DMSO (equivalente a $\sim 0.57\text{ M}$).

Las mezclas de reacción se incubaron de manera secuencial bajo las siguientes condiciones:

- Proteína + buffer de unión, 20 min;
- Proteína + buffer de unión + DNA purificado, 20 min;
- Proteína + buffer de unión + DNA purificado + AIA (concentraciones finales de 22.5 μM y 45 μM), 20 min.

El gel se pre-corrió en primera instancia para eliminar la interferencia de posibles contaminantes bajo las condiciones ya descritas. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en todo momento y, posteriormente, se mezclaron suavemente con 4 µL de buffer de carga nativo 2.5X. y se cargaron en un gel PAGE nativo al 6%. La electroforesis se llevó a cabo a 60 V durante 3 h a 4 °C. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 20 min, se lavó con H₂O tridestilada durante 5 min y se visualizó bajo luz UV.

El desplazamiento de las bandas correspondientes al complejo MibR–DNA se comparó entre las condiciones con y sin AIA, así como frente al control con DMSO (volumen equivalente), con el propósito de determinar el efecto del ligando sobre la afinidad de MibR por la región promotora del gen *ipdC*.

8.3 Análisis Bioinformáticos

Las secuencias tanto de la proteína MibR (WP_051140036.1) como de la región intergénica del gen *ipdC*, que codifica para PPDC (OH82_RS25480), se obtuvieron de la base de datos NCBI. Con esta información se realizó el modelado de la proteína y de la secuencia palindrómica mediante SWISS-MODEL y AlphaFold 3. Los modelos resultantes se analizaron en UCSF Chimera, PyMOL, Discovery Studio Visualizer, AutoDockTools (ADT) y SMART, de acuerdo con los objetivos de este trabajo.

Clustal Omega

Clustal Omega es un programa de alineamiento múltiple que permite comparar tres o más secuencias con alta eficiencia y precisión. En este trabajo, las secuencias de MibR y de sus homólogos se alinearon con Clustal Omega (Sievers et al., 2011) para identificar residuos conservados y regiones variables en el dominio de unión a DNA y en la zona asociada a la dimerización. La línea de consenso del alineamiento se utilizó para localizar posiciones 100% conservadas (*), sustituciones conservativas (:) y menos conservativas (.), lo que permitió proponer residuos candidatos para el análisis estructural y apoyar la interpretación de los resultados de unión a DNA.

Multiple Align Show

Multiple Align Show permite visualizar alineamientos múltiples y resaltar patrones de identidad/similitud mediante esquemas de color. En este trabajo, los alineamientos obtenidos con Clustal Omega se visualizaron con Multiple Align Show (Stothard, 2000), empleando coloración por identidad/similitud para resaltar de forma gráfica los patrones de conservación y facilitar la comparación visual entre MibR y proteínas homólogas descritas en la literatura.

PDB (Protein Data Bank)

El Protein Data Bank (PDB) es un repositorio de estructuras macromoleculares determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X, RMN o criomicroscopía electrónica. A partir del PDB (Berman et al., 2000) se seleccionaron estructuras cristalográficas de proteínas de la familia MarR con resoluciones ≤ 3.0 Å y con anotaciones completas de las cadenas de interés. Estas estructuras sirvieron como plantillas para el modelado por homología de MibR, privilegiando modelos con calidad experimental aceptable y con dominios equivalentes al sitio de unión a DNA y a la región de dimerización.

SWISS-MODEL

SWISS-MODEL es una plataforma para modelado por homología que predice estructuras tridimensionales a partir de plantillas estructurales relacionadas e incluye métricas para evaluar la calidad del modelo. En este trabajo, SWISS-MODEL se utilizó para generar modelos por homología de los homodímeros de MibR (Waterhouse et al., 2018; Studer et al., 2020).

El procedimiento incluyó: (I) identificación de plantillas en el PDB, (II) alineamiento secuencia–plantilla, (III) construcción del modelo y (IV) evaluación de calidad. Como criterios de selección se consideraron el índice GMQE y el puntaje global QMEANDisCo, eligiéndose para análisis posteriores los modelos con valores compatibles con estructuras de resolución intermedia, adecuados para comparaciones estructurales y estudios de *docking* (Waterhouse et al., 2018; Studer et al., 2020).

UCSF Chimera

UCSF Chimera v1.19 es un sistema de visualización y análisis molecular extensible que permite inspeccionar estructuras, editarlas y generar figuras de alta calidad (Pettersen et al., 2004). En este trabajo se utilizó para inspeccionar y editar los modelos de MibR (monómeros y homodímeros) y para realizar empalmes estructurales con proteínas de referencia mediante la herramienta MatchMaker (Pettersen et al., 2004). El RMSD derivado de estas superposiciones se empleó para evaluar la similitud global entre MibR y las proteínas de referencia, así como para localizar residuos equivalentes dentro del bolsillo de unión al ligando. Además, Chimera se utilizó para delimitar regiones de interés en la interfaz MibR–DNA, información que posteriormente guio la definición de cajas de búsqueda en experimentos de *docking* (Pettersen et al., 2004).

AlphaFold 3

AlphaFold 3 es un sistema de predicción estructural basado en inteligencia artificial que permite modelar proteínas y complejos biomoleculares, incluyendo asociaciones proteína–DNA y proteína–ligando. En este trabajo, AlphaFold 3 se utilizó para predecir la estructura tridimensional de MibR y del complejo MibR–DNA, usando como entrada la secuencia de la proteína y la región palindrómica del promotor de *ipdC* (Abramson et al., 2024). La calidad de las predicciones se evaluó mediante el puntaje pLDDT y el mapa PAE. Se consideraron confiables las regiones con $pLDDT \geq 70$, en particular los dominios estructurados del homodímero de MibR y la doble hélice del DNA en la zona palindrómica. El mapa PAE se utilizó para corroborar la orientación relativa entre las cadenas de MibR y el DNA, así como para seleccionar modelos con menor error relativo en la interfaz proteína–DNA.

Discovery Studio Visualizer

Discovery Studio Visualizer es un software de análisis y visualización molecular orientado a la inspección de interacciones y generación de esquemas estructurales. En este trabajo, Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, Dassault Systèmes, 2025) se utilizó para analizar en detalle contactos no covalentes en los modelos seleccionados. En particular, se empleó para identificar interacciones entre residuos de MibR y bases del DNA en la región palindrómica, así como entre MibR y ligandos pequeños en modelos de *docking*. Adicionalmente, se utilizó para generar representaciones esquemáticas de las interacciones y para medir distancias y ángulos relevantes que respaldaran la interpretación estructural de los resultados.

AutoDockTools (ADT)

AutoDockTools (ADT) es una interfaz gráfica del paquete AutoDock empleada para preparar y configurar estudios de *docking* molecular. En este trabajo, ADT se utilizó para preparar archivos de entrada en formato PDBQT (Morris et al., 2009). Para el receptor se añadieron hidrógenos polares y se asignaron cargas parciales tipo Kollman, mientras que para los ligandos se utilizaron cargas compatibles con el motor de cálculo. Con base en la información estructural obtenida en Chimera y Discovery Studio, se definió el tamaño y posición de la grid box alrededor del sitio putativo de unión. Finalmente, ADT se empleó para inspeccionar visualmente las poses de docking obtenidas y seleccionar aquellas compatibles con la conservación de residuos y con la arquitectura del bolsillo de unión.

PyMOL

PyMOL es un programa de visualización y análisis estructural en tres dimensiones que permite generar imágenes de alta calidad, además de cuantificar interacciones a nivel atómico. En este trabajo, este software se empleó como herramienta complementaria para analizar complejos generados por modelado y *docking* (Schrödinger, LLC, 2015). Se utilizaron sus funciones de medición para cuantificar distancias donador–aceptor y ángulos en posibles puentes de hidrógeno, así como contactos hidrofóbicos y apilamientos π – π entre residuos aromáticos y bases nitrogenadas del DNA o ligandos aromáticos. Las imágenes finales de los modelos y complejos presentados en esta tesis se generaron en PyMOL, estandarizando orientación, escala y esquema de colores.

SMART

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) es una plataforma orientada a la identificación de dominios conservados y motivos funcionales en proteínas, útil para contextualizar la arquitectura modular de reguladores transcripcionales. En este trabajo, SMART se empleó para identificar dominios conservados en MibR y sus homólogos (Letunic et al., 2021). Este análisis confirmó la presencia del dominio wHTH característico de la familia MarR y permitió contextualizar la organización modular de MibR dentro de reguladores transcripcionales relacionados, apoyando la hipótesis funcional propuesta para esta proteína.

9. RESULTADOS

9.I Evaluación experimental de la interacción de MibR y la región promotora del gen *ipdC*

9.I.I Expresión de la proteína MibR

Con el fin de expresar y purificar MibR, previamente en el laboratorio, el gen *mibR* se clonó en el plásmido de expresión pGEX-4T1 (GE Healthcare Life Sciences) obteniendo el plásmido pGEXGST-*mibR*. En pGEXGST-*mibR*, *mibR* quedó fusionado de manera traduccional al gen *gst* generando una proteína híbrida GST-MibR de aproximadamente 43 kDa (Figura 6). Este plásmido se transfirió a cepas de *E. coli* BL21 - *mibR* (Jijón-Moreno, 2017). Posteriormente, se evaluaron las condiciones de expresión de la proteína (Yañez Meza, 2022). La máxima expresión de MibR se obtuvo en medio LB (DO600 entre ~0.5 – 0.6) complementado con 0.1 mM de IPTG como inductor y con un tiempo de inducción de 3 horas a 30 °C, a 150 r.p.m. (Figura 7).

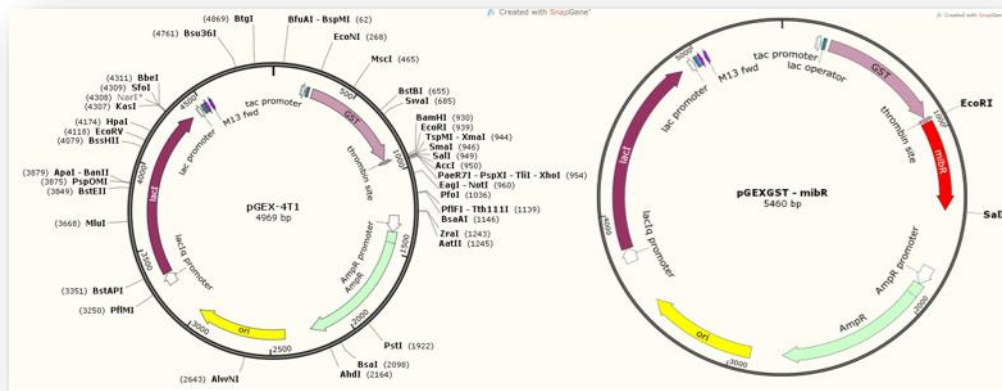


Figura 6. Cepa de *E. coli* BL21 con el plásmido de expresión pGEX – 4T dando como resultado el plásmido pGEXGST – *mibR*

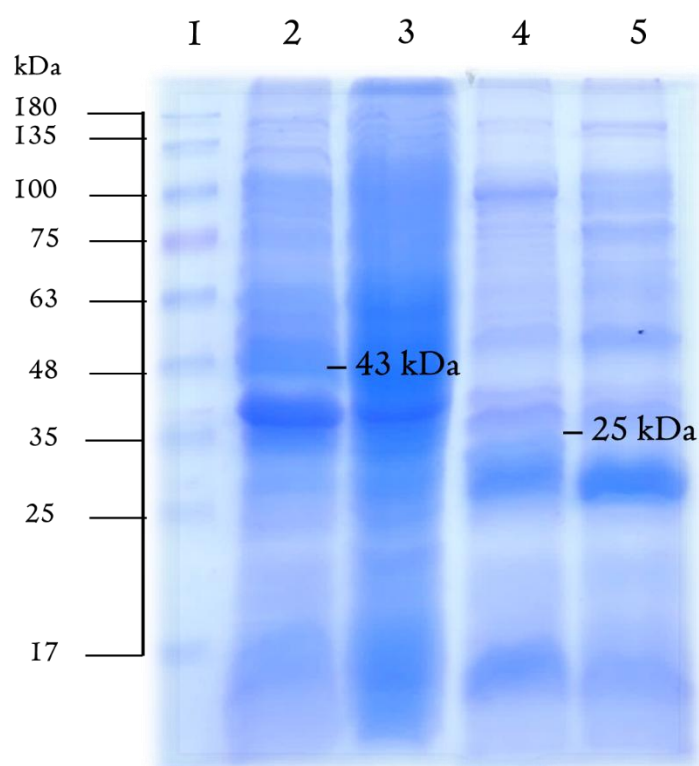


Figura 7. Corrimiento electroforético de extractos proteicos de *E. coli* BL21 pGEXGST- *mibR* y *E. coli* BL21 pGEX-4TI en SDS-PAGE al 10 %.

Carril 1: marcador de peso molecular (MWM). Carril 2: fracción insoluble (pellet) de *E. coli* BL21 pGEXGST-*mibR*. Carril 3: fracción soluble (sobrenadante, SN) de *E. coli* BL21 pGEXGST-*mibR*, con una banda ~43 kDa correspondiente a MibR. Carriles 4 y 5: sobrenadantes de *E. coli* BL21 pGEX-4TI que expresan GST (~25 kDa)..

9.1.2 Análisis por Western Blot

Para verificar la expresión de la proteína MibR bajo las condiciones descritas, se realizó un análisis por Western blot empleando un extracto de LibR-GST como control de referencia. En el carril 1 se cargó la proteína GST-LibR, en el carril 2 el marcador de peso molecular y en el carril 3 el sobrenadante (SN) de *E. coli* BL21 pGEXGST-*mibR* inducido con IPTG 0.1 mM. En este último se detectó una banda principal de aproximadamente 43 kDa junto con una señal doble (doblete) de menor movilidad, patrón compatible con la detección de la proteína de fusión GST-MibR en el SN y con la posible presencia de formas parcialmente procesadas de la misma, como se ha descrito para otras proteínas de fusión expresadas en *E. coli* BL21 (Figura 8).

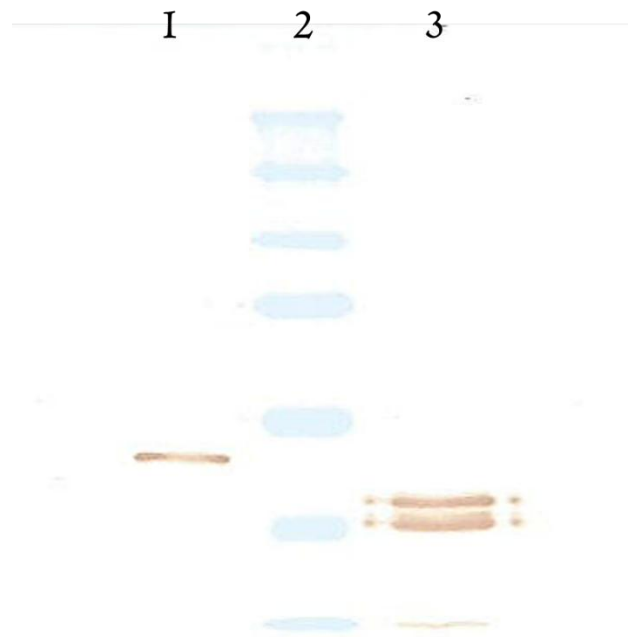


Figura 8. Análisis por Western Blot.

Carril 1: fracción soluble (SN) de *E. coli* BL21 pGEXGST-*libR* (control positivo). Carril 2: marcador de peso molecular (MWM). Carril 3: fracción soluble (SN) de *E. coli* BL21 pGEXGST-*mibR*, en la que se observa un doblete alrededor de 43 kDa correspondiente a la proteína MibR fusionada a GST.

9.I.3 Purificación y cuantificación de la proteína MibR

Para la realización de los ensayos de EMSA, se purificó y cuantificó la proteína GST-MibR para obtener concentraciones adecuadas necesarias para llevarlos a cabo. En la figura 9 representativa de los ensayos de purificación, se muestra el análisis en SDS-PAGE al 10% de la purificación de la proteína, donde se puede observar el doblete característico de ésta. Así mismo, se realizó la cuantificación de la proteína utilizando una curva estándar a 470 / 610 nm con albúmina sérica bovina (BSA), expresando la concentración proteica en términos de peso equivalente de BSA.

La purificación de la proteína MibR se realizó de manera constante para tenerla recién purificada en cada uno de los ensayos de EMSA que se realizaron.

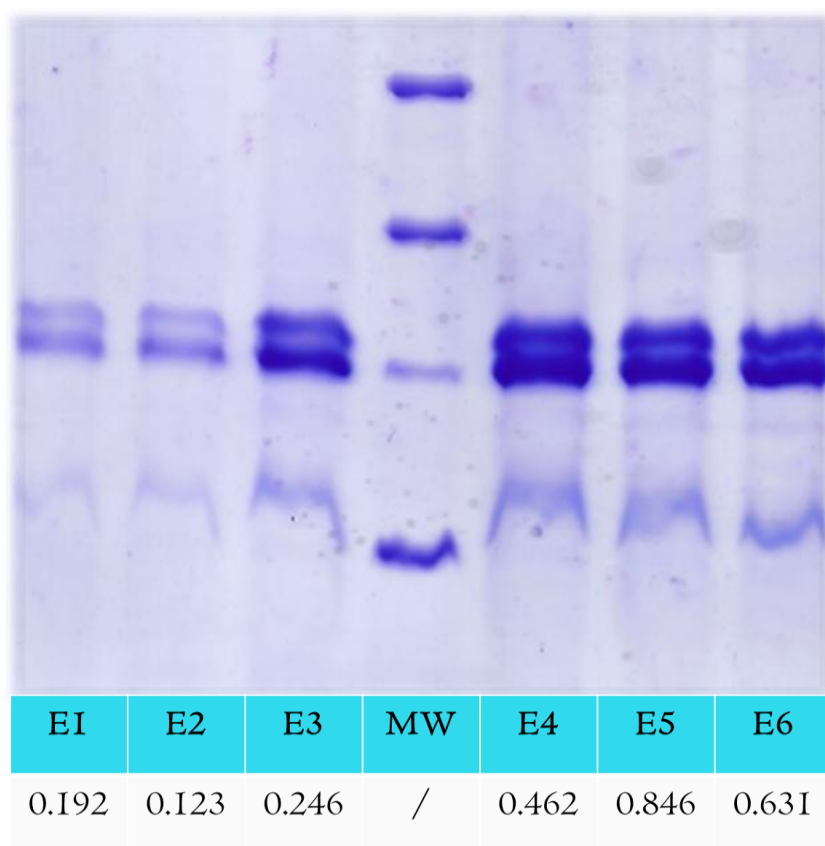


Figura 9. Corrimiento electroforético y cuantificación de la proteína MibR purificada.

Se marca la serie de eluciones proteicas (E), enumeradas (E1 - E6) MW: Marcador de peso molecular, así como la concentración (ug/uL) de MibR por eluido.

9.I.4 Amplificación y purificación de la región promotora del gen *ipdC*

La región promotora del gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 fue amplificada mediante PCR touchdown como se indicó en la sección de materiales y métodos., Como se muestra en la figura 10, el fragmento obtenido fue de 306 pb.

Tras la purificación del producto amplificado, se obtuvo una banda única del tamaño esperado, evidenciando la integridad del fragmento y la ausencia de contaminantes (Figura 10).

Este DNA purificado fue utilizado posteriormente en los ensayos de EMSA para evaluar su interacción con la proteína MibR.

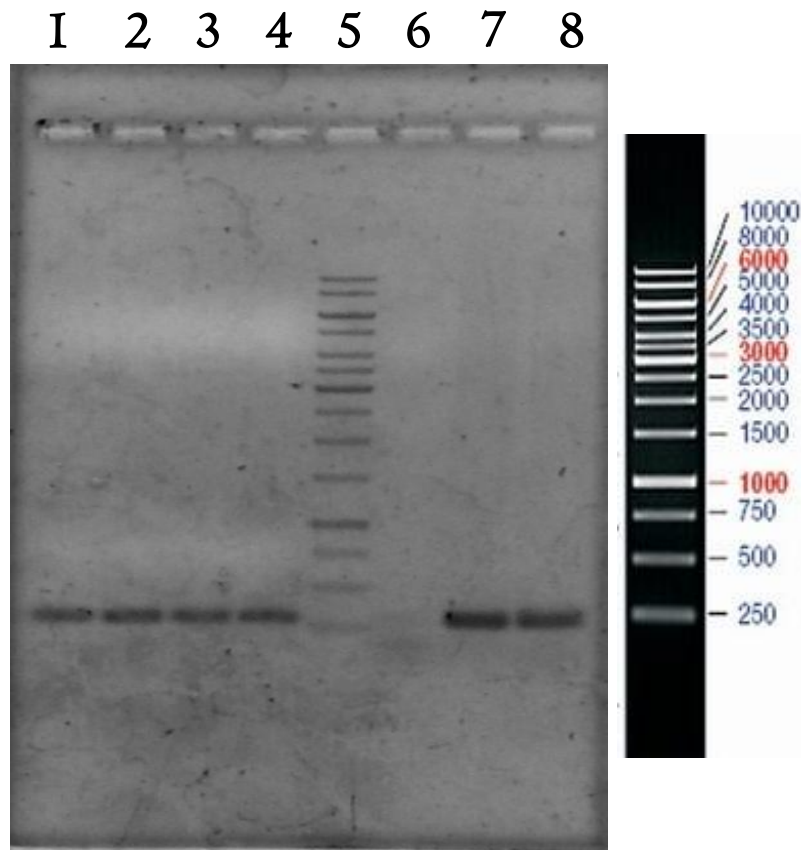


Figura 10. Corrimiento electroforético de la región promotora *ipdC* de *A. brasilense* Sp7.

Carriles 1–4, fragmento de la región promotora *ipdC* purificado; carril 5, marcador de peso molecular (MWM); carril 6, control negativo (CN); carriles 7–8, producto amplificado de la región promotora *ipdC*. La banda única de ~306 pb observada en los carriles correspondientes confirma la especificidad de la amplificación y la integridad del fragmento obtenido.

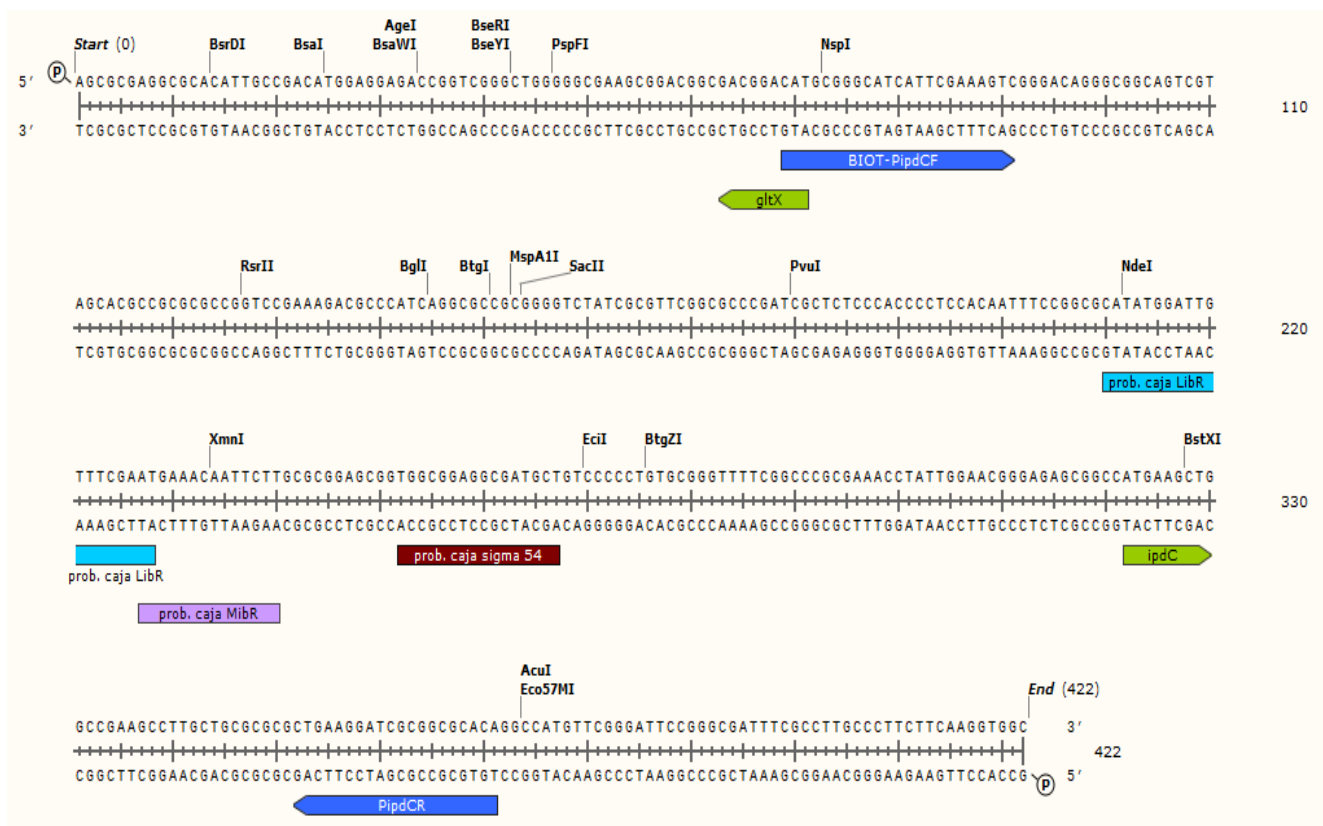


Figura II. Mapa de la región intergénica de 250 pb entre *gltX* e *ipdC* en *A. brasilense* Sp7.

Se indica el fragmento amplificado por sus respectivos cebadores (BIOT-PipdCF/PipdCR) y los principales elementos en cis identificados *in silico*: probables cajas LibR y MibR, sitio de unión a σ^{54} y localización relativa de los sitios de restricción utilizados.

9.1.5 Interacción de MibR con la región promotora del gen *ipdC* (EMSA)

El análisis de interacción proteína–DNA mediante EMSA confirmó que MibR es capaz de unirse específicamente a la región promotora del gen *ipdC*.

Como se muestra en la figura 12, MibR provocó un retardo en la movilidad de la sonda de DNA cuando se utilizó a una concentración de 78.71 a 314.84 nM. El aumento de la concentración de MibR en las mezclas de reacción provocó una disminución gradual de la sonda libre y un aumento en la intensidad del complejo MibR–DNA, lo que indica una interacción dependiente de la concentración.

En contraste, la proteína GST sola no mostró ningún efecto en la movilidad de la sonda de DNA, confirmando la especificidad de unión de MibR.

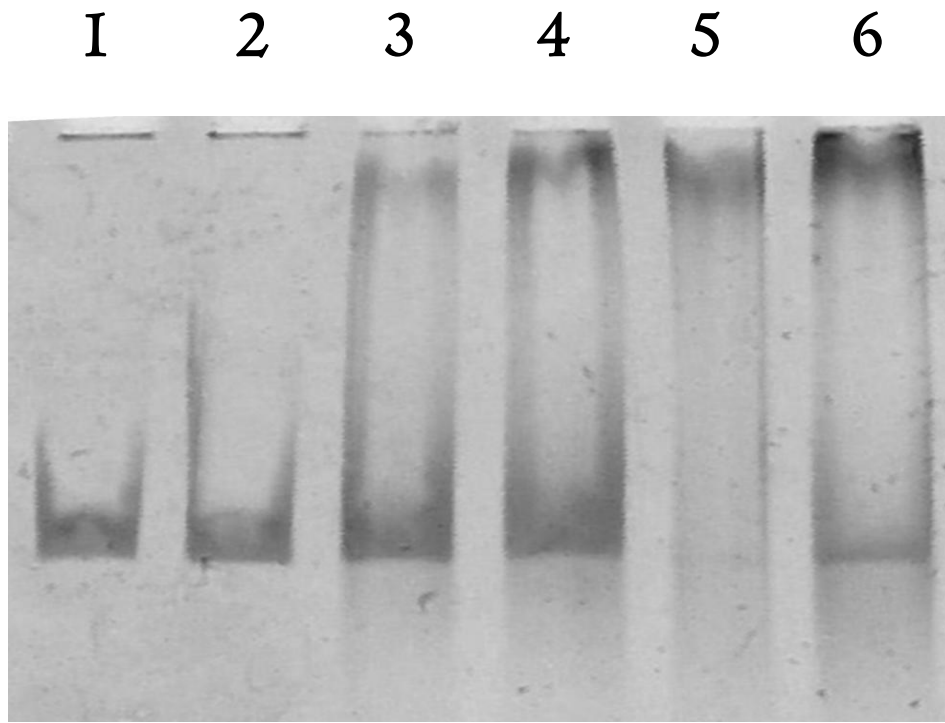


Figura 12. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) del complejo MibR – *ipdC*.

Se evaluó la unión de MibR a la región promotora del gen *ipdC* (200 ng) mediante concentraciones ascendentes de proteína. Carril 1: sonda de *ipdC*. Carril 2: sonda de *ipdC* + GST (573 nM, control positivo). Carriles 3–6: sonda de *ipdC* + MibR a 78.7, 118.6, 275.5 y 314.8 nM, respectivamente. El desplazamiento retardado del DNA aumenta de manera proporcional con la concentración de MibR, confirmando una interacción específica y dependiente de la proteína.

9.1.6 Efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre el complejo MibR – *ipdC*

Para evaluar el posible efecto del AIA sobre la afinidad de MibR por la región promotora del gen *ipdC*, se realizaron ensayos de EMSA en presencia de AIA a diferentes concentraciones.

En comparación con la condición sin ligando, la adición de AIA al complejo DNA-MibR provocó una disminución gradual en la intensidad de la banda retardada y un incremento de la intensidad de la banda de DNA (sonda libre) (Figura 13).

Este resultado indica que el AIA promueve la disociación del complejo MibR–DNA, probablemente mediante un cambio conformacional en la proteína que reduce su afinidad por el promotor del gen *ipdC*.

El control con DMSO no produjo efecto alguno, confirmando que el desplazamiento es consecuencia directa de la presencia del AIA.

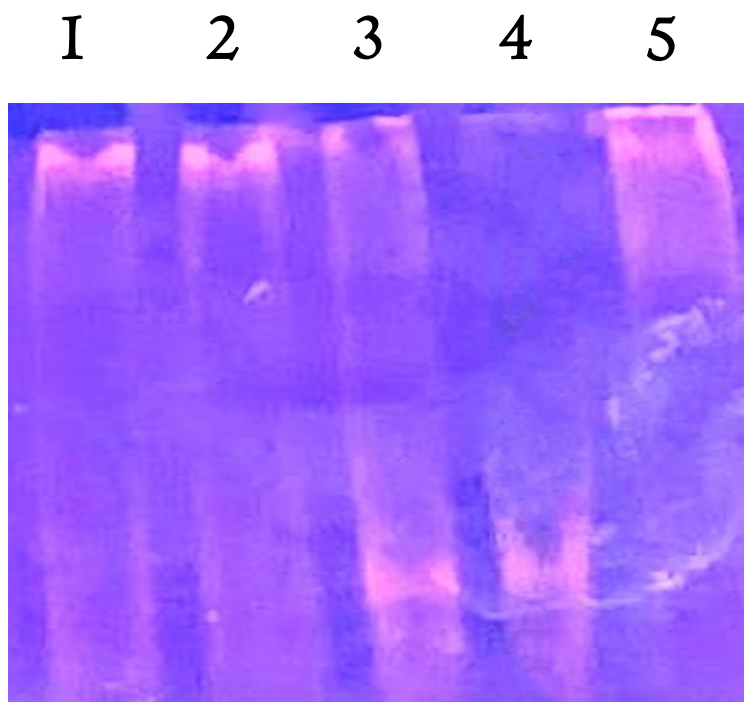


Figura 13. Ensayo EMSA mostrando el efecto del ácido indol-3-acético (AIA) sobre la unión MibR – *ipdC*.

En todos los carriles se utilizaron 200 ng del promotor de *ipdC* y 325.14 nM de MibR. Carriles 1 y 2, complejo MibR–DNA en ausencia de AIA. Carriles 3 y 4, mismas condiciones en presencia de 22.5 y 45 μ M de AIA, respectivamente. Carril 5, control con DMSO (volumen equivalente) sin AIA. El aumento en la concentración de AIA se acompaña de una disminución en la intensidad del complejo desplazado y de la reaparición de DNA libre, lo que indica que AIA reduce la formación del complejo MibR–*ipdC* bajo estas condiciones.

9.2 Análisis estructural y funcional *in silico* del complejo MibR – *ipdC* – AIA

9.2.1 Predicción estructural del complejo MibR en interacción con la región palindrómica del gen *ipdC*

La predicción estructural del complejo MibR–DNA se realizó en la plataforma AlphaFold 3 (Abramson et al., 2024), empleando como entrada la secuencia aminoacídica de MibR (*A. brasilense* Sp7) y la región palindrómica de 20 pb, constituida por dos repetidos invertidos de 8 pb, separadas por 4 pb, localizada en el promotor del gen *ipdC* (5'-ATTGTTTTCGAATGAAACAAT-3').

El modelo fue configurado para incluir dos copias de la proteína (homodímero) y una copia del fragmento de DNA, junto con iones Mg^{2+} y Cl^- añadidos en el entorno de predicción (Figura I4).

El procesamiento arrojó un modelo con valores de confianza pLDDT > 90 en la mayoría de los residuos y puntuaciones ipTM = 0.89 y pTM = 0.88, indicando una predicción de alta fiabilidad tanto en el ensamblaje proteico como en su interacción general con el DNA.

Este resultado es notable, dado que AlphaFold 3 raramente produce predicciones de complejos proteína–DNA con esta coherencia estructural, lo que sugiere una organización espacial particularmente estable del sistema MibR–*ipdC*.

El mapa de error posicional (PAE) mostró desviaciones menores a 5 Å, reforzando la estabilidad del ensamblaje y la orientación precisa de las subunidades sobre el surco mayor del DNA.

La estructura final evidenció una dimerización asimétrica de MibR, donde cada monómero adopta una conformación ligeramente distinta al interactuar con la doble hélice.

Esta disposición permite que uno de los dominios wHTH establezca contactos más estrechos con la región palindrómica, mientras el otro conserva una orientación complementaria, compatible con un mecanismo de reconocimiento diferencial del DNA.

En conjunto, la predicción respalda el modelo funcional de MibR como **represor dimérico asimétrico**, cuya actividad podría ser modulada por la unión de ligandos, en concordancia con los resultados experimentales obtenidos mediante EMSA.

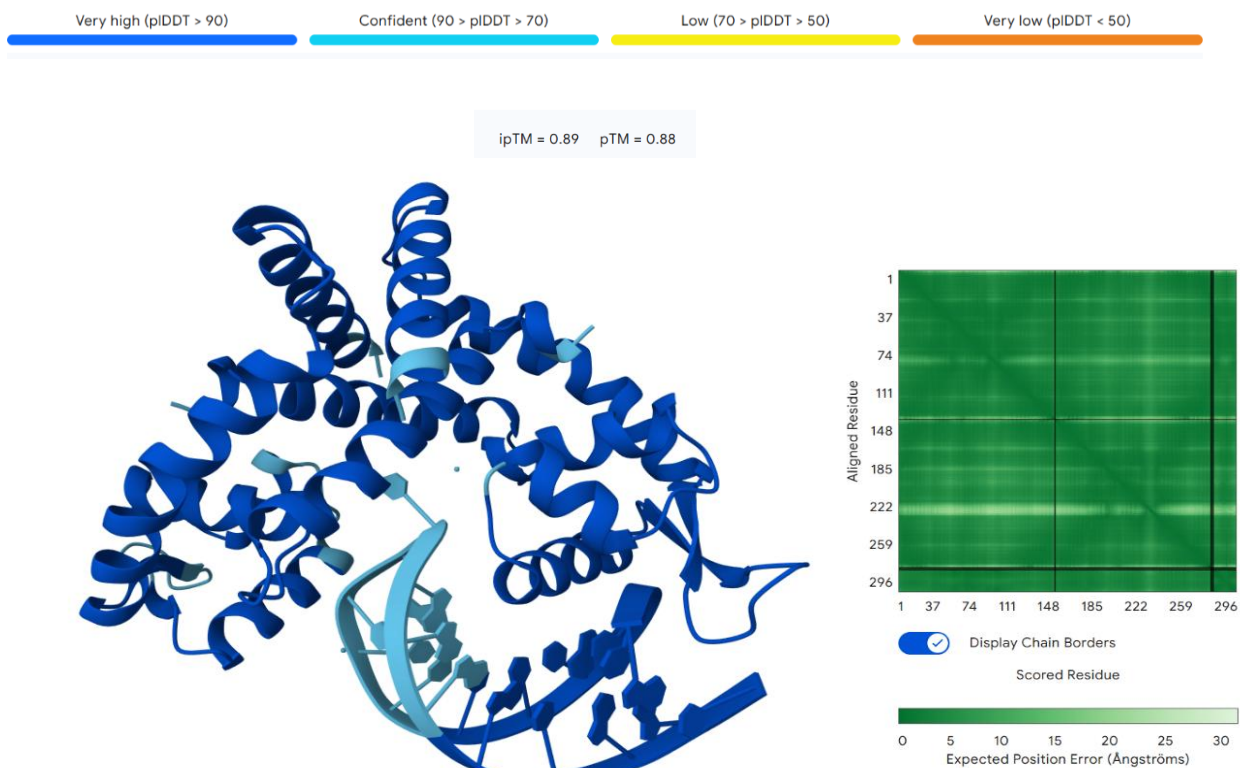


Figura I4. Predicción estructural del complejo MibR – *ipdC* obtenida con AlphaFold 3.

El modelo muestra a MibR como un homodímero unido a la secuencia palindrómica del promotor del gen *ipdC*. La gradación de azules corresponde a los valores de pLDDT: los tonos más intensos indican una confianza muy alta en la posición de la proteína, mientras que ligeras variaciones de color entre MibR y la cadena de DNA reflejan diferencias en la precisión del modelo para cada componente. Los valores globales de ipTM y pTM, junto con el mapa de error (PAE) de AlphaFold, respaldan la conformación dimérica propuesta y la organización del complejo MibR – *ipdC*.

9.2.2 Análisis de las interacciones residuo–base del complejo MibR – DNA mediante UCSF Chimera

El análisis integrado de puentes de hidrógeno y contactos no covalentes entre MibR y la región palindrómica del gen *ipdC*, realizado mediante UCSF Chimera, reveló una red jerarquizada de interacciones que define tanto el reconocimiento específico como la estabilidad estructural del complejo (Figura 15). En este sentido, el análisis *in silico* mostró que los contactos más fuertes se concentraron en los residuos Arg86A, Arg60A y Gln14B, los cuales establecen interacciones directas con las bases del DNA. La Arg86A forma enlaces con las bases Adenina 1 (átomos N3 y C2) y Timina 20 (O2, C1' y H1'), actuando como el principal punto de anclaje en ambos extremos del palíndromo. Por su parte, la Arg60A establece múltiples interacciones con Timina 3 (O4, C5, C6 y C7), consolidando el reconocimiento en el extremo 5' del fragmento.

En la región central, la Gln14B reconoce específicamente la base Timina 12 (O4 y N3) a través de su grupo amida (NE2 y OE1), reforzando la complementariedad del dímero en la lectura del palíndromo.

Los residuos Gln49A, Ser50A, Asp59A y Thr62A contribuyen al anclaje estructural mediante contactos con los oxígenos fosfato (OP1, OP2) de las Guaninas 4 y 13, estabilizando el dominio wHTH sobre el surco mayor del DNA. Este hallazgo es particularmente significativo, ya que el dominio wHTH de MibR comprende aproximadamente los residuos 50 a 150, coincidiendo con la región donde se concentra la mayoría de los contactos detectados en Chimera, lo que refuerza su papel como módulo lector y estabilizador de la interacción proteína–DNA. Asimismo, la Tyr88A, junto con Ser61A y Ser87A, establece interacciones más débiles de tipo polar y de Van der Waals con las bases Guanina 4 y Timina 5, ajustando la orientación del complejo sin participar directamente en la lectura de secuencia.

En conjunto, los resultados obtenidos en UCSF Chimera confirman una dimerización asimétrica funcional, donde un monómero de MibR concentra la lectura de bases (Arg60A, Arg86A, Gln14B) y el otro refuerza la estabilidad mediante interacciones con el esqueleto fosfato (Gln49A, Ser50A, Asp59A, Thr62A).

Esta disposición garantiza un acoplamiento firme y diferenciado, coherente con la arquitectura del dominio wHTH sobre la región palindrómica del promotor del gen *ipdC*.

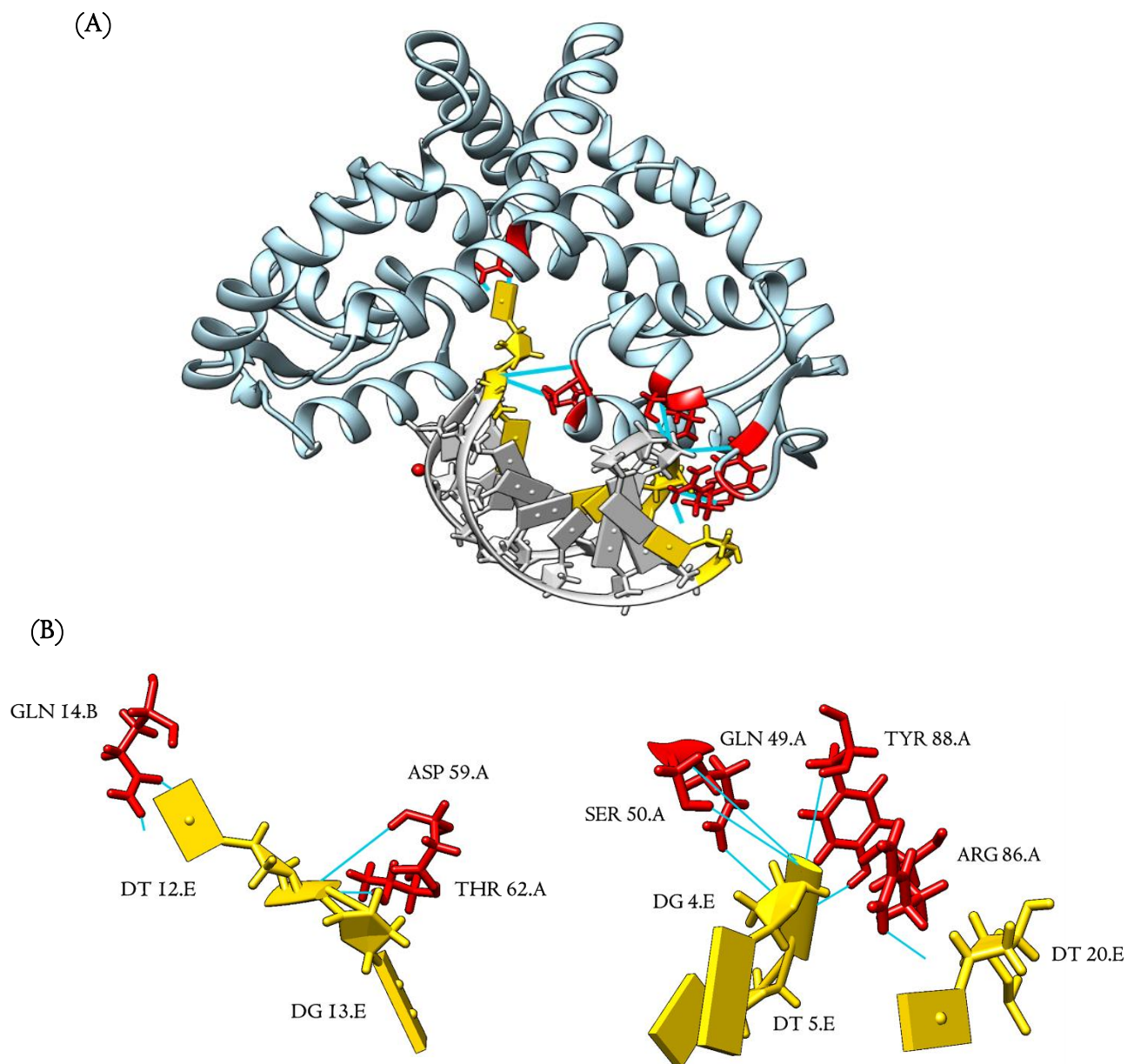


Figura 15. Interacciones específicas entre MibR y la región palindrómica del gen *ipdC*.

(A) Vista general del complejo MibR–DNA, mostrando el acoplamiento del dominio wHTH (residuos 49–88) sobre la doble hélice.

(B) Detalle de las interacciones identificadas mediante la herramienta FindHBond de UCSF Chimera, que reveló 10 puentes de hidrógeno entre los residuos Gln49, Ser50, Asp59, Thr62, Arg86 y Tyr88 (cadena A) y Gln14 (cadena B) con las bases DG4, DT5, DT12, DG13 y DT20.

Los residuos de MibR implicados en la interacción se muestran en rojo, mientras que las bases del DNA que participan en los contactos se representan en amarillo, resaltando la topología de unión del dominio wHTH sobre el surco mayor.

9.2.3 Modelado por homología y empalme estructural de MibR

El modelo tridimensional de MibR fue obtenido mediante Swiss-Model, empleando como plantilla la proteína MarR73 de *Variovorax paradoxus* (PDB ID: 7KF0; Conway et al., 2022), cristalizada en complejo con AIA.

El modelo mostró una identidad de secuencia del 22.7 % y una cobertura aproximada del 70 %, suficiente para conservar la arquitectura global característica de la familia MarR-like.

El análisis de calidad estructural arrojó valores de GMQE = 0.55 y QMEANDisCo = 0.63 ± 0.05 , compatibles con modelos de resolución intermedia, y predijo un estado oligomérico del tipo homodímero, coherente con la función reguladora de MibR.

El empalme estructural entre MibR y MarR73 se realizó en UCSF Chimera v1.19 mediante la herramienta MatchMaker, utilizando alineamiento de secuencia (Needleman–Wunsch, matriz BLOSUM-62) combinado con la correspondencia de estructuras secundarias.

El ajuste reveló una superposición estable (RMSD ≈ 2.0 Å) con coincidencia espacial en las hélices $\alpha 2$ – $\alpha 4$ del dominio regulador.

Este resultado permitió identificar en MibR un bolsillo potencial de unión para el AIA, equivalente al sitio observado experimentalmente en MarR73, apoyando la conservación funcional entre ambos reguladores.

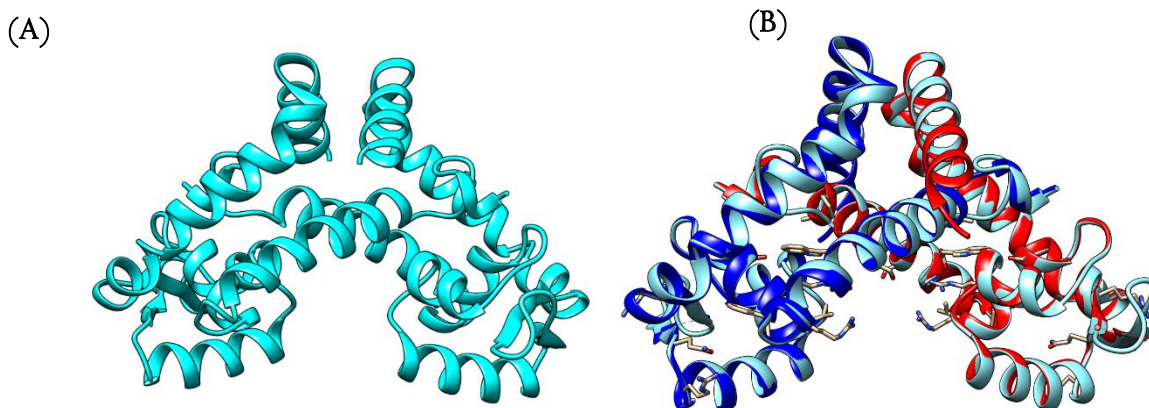


Figura I6. Comparación estructural entre MibR y MarR73.

(A) Modelo tridimensional de MibR de *A. brasilense* Sp7 obtenido por homología en Swiss-Model, predicho como homodímero usando como plantilla a MarR73 de *V. paradoxus* (PDB: 7KF0; GMQE = 0.55; QMEANDisCo = 0.63 ± 0.05).

(B) Superposición estructural realizada en UCSF Chimera mediante MatchMaker, donde MibR se muestra en cian y MarR73 en rojo (cadena A) y azul (cadena B), evidenciando la conservación de la arquitectura dimérica y del dominio regulador característico de la familia MarR.

9.2.4 Identificación y validación del bolsillo de unión del ácido indol-3-acético (AIA) en MibR mediante UCSF Chimera

El análisis estructural del posible sitio de unión del AIA en MibR se realizó a partir de un modelo tridimensional obtenido por homología en Swiss-Model, empleando como plantilla la proteína MarR73 de *V. paradoxus*, cristalizada en complejo con AIA (PDB ID: 7KFO).

Posteriormente, ambos modelos —MarR73-AIA y MibR— fueron superpuestos en UCSF Chimera para identificar las regiones equivalentes del dominio regulador y determinar la conservación topológica del probable bolsillo de unión.

En MibR, el análisis de contactos interatómicos mediante Find Clashes/Contacts reveló 174 interacciones no covalentes con el AIA, concentradas principalmente en cinco residuos clave: Leu32.B, Tyr35.B, Arg38.B, Phe45.A e Ile66.A (Figura 17).

Estos aminoácidos forman un bolsillo hidrofóbico-aromático compacto, equivalente al observado en MarR73, en el que Tyr35.B y Phe45.A participan en apilamientos π – π con el anillo indólico, mientras que Arg38.B establece interacciones catión– π y posibles puentes de hidrógeno con los oxígenos carboxílicos del ligando.

Por su parte, Leu32.B e Ile66.A contribuyen al confinamiento hidrofóbico que estabiliza la orientación del AIA en el centro del bolsillo.

La similitud espacial con MarR73 sugiere que MibR comparte un mecanismo conservado de regulación alostérica, en el cual la unión del AIA podría inducir un cambio conformacional que reduzca la afinidad del dímero por el DNA, promoviendo la inhibición de unión en la región promotora del gen *ipdC*.

Esta hipótesis se refuerza por la proximidad del bolsillo al dominio wHTH (residuos $\approx$ 50–150), región responsable del reconocimiento de la secuencia palindrómica del promotor.

En conjunto, el empalme estructural y el análisis de contactos confirman que el AIA se acopla en un sitio funcionalmente equivalente al de otros reguladores MarR-like, validando su posible papel como ligando modulador de MibR.

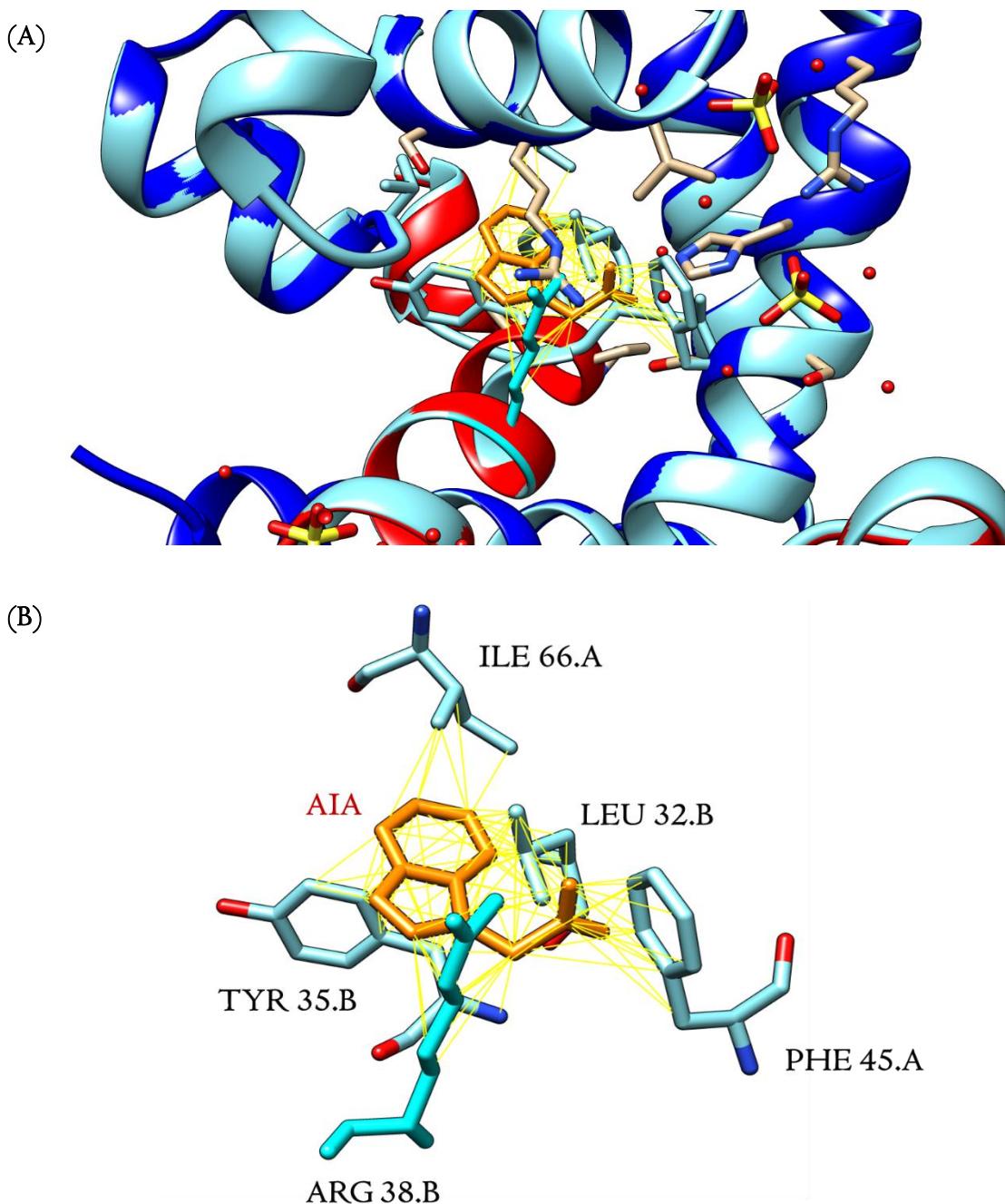


Figura 17. Bolsillo de unión del ácido indol-3-acético (AIA) en MibR.

(A) Vista general del complejo mostrando el ligando AIA (naranja) localizado en el dominio regulador. (B) Detalle de las interacciones identificadas por superposición estructural y análisis de contactos en UCSF Chimera. Las interacciones ligando-proteína se evaluaron con Find Clashes/Contacts (líneas amarillas). Los residuos Leu32.B e Ile66.A contribuyen al confinamiento hidrofóbico que estabiliza la orientación del ligando, mientras que Tyr35.B y Phe45.A refuerzan un entorno hidrofóbico-aromático mediante apilamientos π - π con el anillo indólico. Finalmente, Arg38.B actúa como el principal residuo de anclaje polar, estableciendo interacciones catión- π /electrostáticas con el sistema aromático y un puente de hidrógeno con los oxígenos del grupo carboxílico del AIA.

9.2.5 *Docking* molecular de MibR con ácido indol-3-acético (AIA)

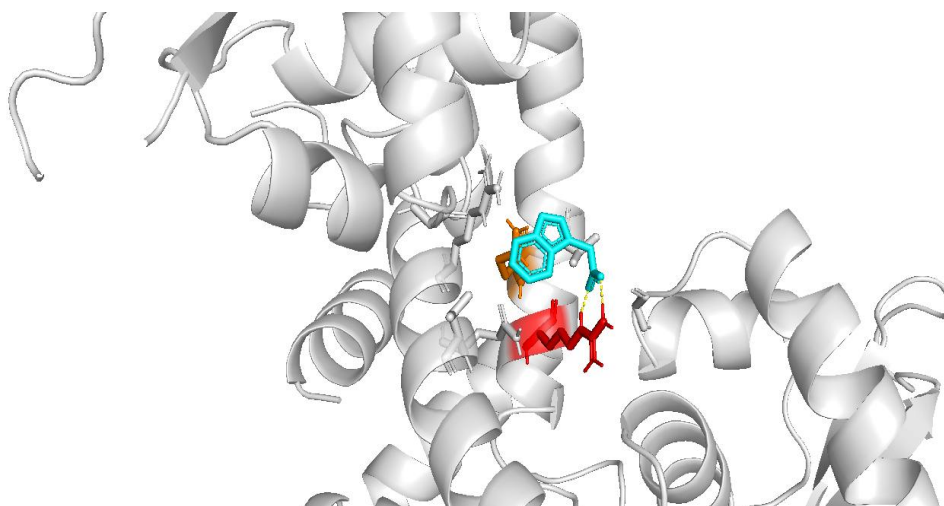
Con el fin de corroborar que el bolsillo conservado en MibR podía alojar al ácido indol-3-acético (AIA), se realizó un *docking* molecular tomando como punto de partida el modelo tridimensional de MibR obtenido por homología en Swiss-Model y el bolsillo identificado por superposición estructural con el regulador MarR73 de *V. paradoxus* (PDB: 7KF0), cristalizado con AIA. Como se observa en la superposición estructural realizada en UCSF Chimera (Figura I6 y I7), el surco formado por las hélices $\alpha 2$ – $\alpha 4$ y el lazo regulador de MibR ocupa la misma posición relativa que el sitio alostérico descrito para MarR73. A partir de esta alineación, se tomó el centro geométrico de los residuos equivalentes a Leu32B, Tyr35B, Arg38B, Phe45A e Ile66A y se definió alrededor de él la región de búsqueda para el *docking* en AutoDock.

El acoplamiento situó al AIA en una cavidad hidrófobo-aromática delimitada principalmente por los residuos Leu32.B, Tyr35.B, Arg38.B, Phe45.A e Ile66.A, exactamente los mismos que en el análisis de contactos de Chimera aparecieron como los que concentraban la mayor parte de las interacciones con el ligando. En la pose seleccionada, el anillo indólico del AIA queda orientado hacia el interior del bolsillo, apilado frente a los anillos aromáticos de Tyr35.B y Phe45.A, favoreciendo contactos π – π y apilamientos hidrofóbicos, mientras que la cadena lateral de Leu32.B contribuye a cerrar lateralmente la cavidad y a dar carácter hidrofóbico al entorno inmediato del ligando (Figura I8).

Un rasgo relevante del modelo es la posición de **Arg38.B**, que se proyecta hacia el grupo carboxilo del AIA y puede establecer contactos electrostáticos / puentes de hidrógeno con ese extremo cargado del ligando; esto coincide con lo que se observa en las imágenes de PyMOL, donde Arg38.B aparece en rojo rodeando el grupo ácido del AIA. Esta interacción polar es la que “ancla” la orientación del ligando dentro del bolsillo y explica “por qué”, aun cuando el entorno es mayoritariamente hidrofóbico, el AIA adopta una pose definida. De forma complementaria, residuos vecinos del mismo sector del modelo como Gln41.B y Val42.B quedan lo bastante cerca como para aportar contactos de ajuste (van der Waals o H-bond débiles) que estabilizan la misma pose.

Las representaciones en PyMOL se usaron para depurar la visualización: la proteína se mostró en cartoon en tonos claros y el AIA en cian, mientras que los residuos del bolsillo se colorearon según su función: aromáticos/hidrofóbicos (Leu32.B, Tyr35.B, Phe45.A, Ile66.A) en tonos naranja/gris y el residuo cargado Arg38.B en rojo, destacando la zona de interacción con el carboxilato. Esta vista permitió confirmar que el ligando queda completamente contenido en la depresión formada por las hélices cercanas al lazo regulador, en la misma región donde MarR73 reconoce al AIA, lo que apoya que MibR pueda utilizar un mecanismo alostérico equivalente (Figura I8).

(A)



(B)

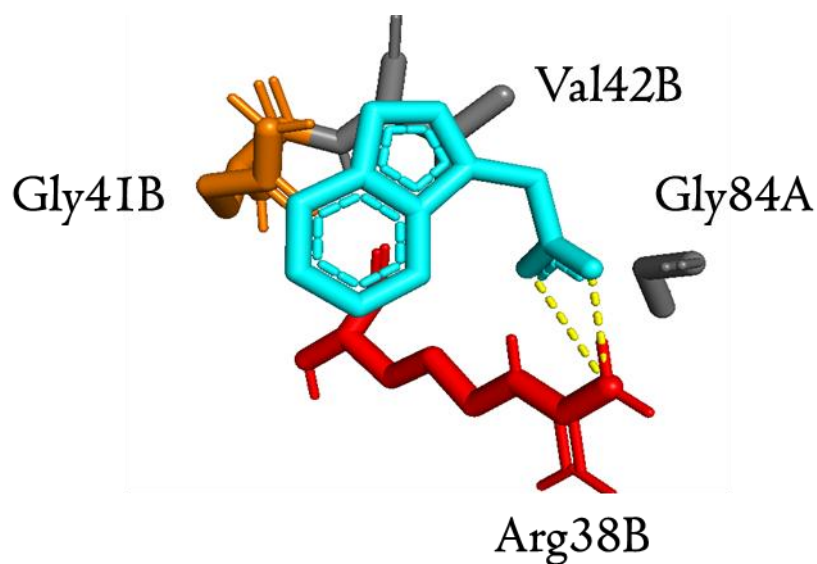


Figura 18. Acoplamiento molecular de AIA en el bolsillo regulador de MibR

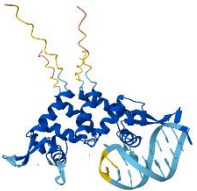
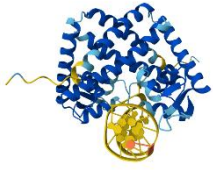
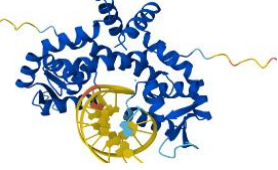
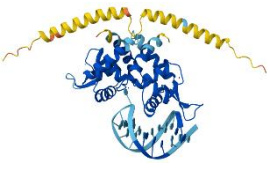
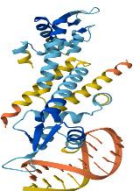
(A) Vista general del *docking* (visualizado en PyMOL) mostrando al AIA (cian) acomodado en la cavidad formada por las hélices internas de MibR.

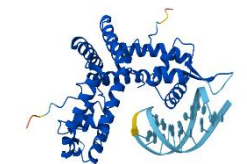
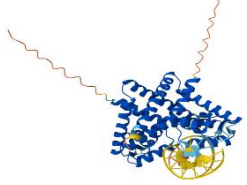
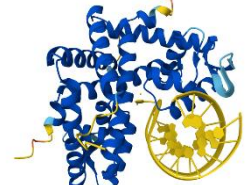
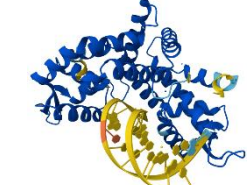
(B) Detalle de las interacciones: Arg38B (rojo) establece dos puentes de hidrógeno con el grupo ácido del AIA (3.2–3.7 Å), a diferencia del análisis de Chimera donde solo se observó un contacto; Gln41B y Val42B (naranja/gris) contribuyen al cierre del bolsillo por contactos de proximidad. Esta conformación respalda que Arg38B actúa como residuo ancla del ligando en el sitio equivalente al descrito para MarR.

9.2.6 Búsqueda de proteínas homólogas en RAST

La búsqueda de proteínas homólogas a MibR en el genoma de *A. brasilense* Sp7 mediante la plataforma RAST permitió identificar doce proteínas anotadas como reguladores tipo MarR (Tabla 3). Todas las secuencias presentan longitudes comprendidas entre 126 y 178 aminoácidos, y comparten un dominio wHTH anotado como HTH_MARR por SMART, localizado en una región equivalente (aprox. entre los residuos iniciales 4–54 y finales 105–139, según el homólogo). El alineamiento global por Clustal Omega usando MibR como referencia reveló porcentajes de identidad relativamente bajos, en el rango de ~17–31 %, lo cual es coherente con lo descrito para la familia MarR, cuyas secuencias suelen conservar menos del 30 % de identidad global entre linajes aun cuando mantienen funciones regulatorias similares (Nazaret et al., 2023). Para cada homólogo se generaron modelos tridimensionales de cada complejo en conjunto con la región palindrómica encontrada en la región promotora del gen *ipdC* mediante AlphaFold 3. En todos los casos, las predicciones muestran un núcleo estructural típico de MarR, organizado como dímero y con el motivo wHTH orientado hacia el surco mayor del DNA.

Tabla 3. Proteínas homólogas a MibR en el genoma de *A. brasilense* Sp7.

Código NCBI	No. aa de la proteína	Rango del dominio wHTH	% identidad global	Dominio	Modelo 3D
WP_035670525.1	133	33 - 106	22.88		
WP_051140205.1	142	18 - 118	30.0		
WP_014240398.1	157	28 - 128	18.98		
WP_035675085.1	146	35 - 135	31.51		
WP_035670909.1	146	19 - 123	17.6		
WP_079284972.1	126	04 - 105	22.41		

Código NCBI	No. de aa de la proteína	Rango del dominio wHTH	% identidad global	Dominio	Modelo 3D
WP_035678360.I	158	38 - 139	21.71		
WP_035679514.I	152	30 - 130	27.08		
WP_051140661.I	178	54 - 124	21.29		
WP_035680630.I	160	29 - 130	17.48		
WP_051140780.I	158	33 - 134	20.41		
WP_051140919.I	161	36 - 136	30.0		

10. DISCUSIÓN

En este trabajo se abordó la regulación del gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 desde la perspectiva de la proteína MibR, un regulador transcripcional de la familia MarR. Mediante una combinación de aproximaciones experimentales (expresión, purificación y EMSA) y análisis *in silico* (modelado tridimensional, búsqueda de homólogos, alineamiento estructural y *docking* molecular), se generaron evidencias que apoyan el papel de MibR como regulador negativo cuya afinidad por la región promotora de *ipdC* puede ser modulada por el ácido indol-3-acético (AIA). Estos resultados se discuten a la luz de lo reportado para otros reguladores MarR en bacterias asociadas a plantas y en modelos estructurales bien caracterizados (Gao et al., 2017); Nazaret et al., 2023).

10.1 Interacción de MibR con la región promotora del gen *ipdC*

Los ensayos de expresión de la proteína recombinante GST–MibR en *E. coli* BL21 permitieron obtener la proteína en forma soluble (~43 kDa), lo que constituyó el primer requisito para evaluar su interacción con el DNA. El análisis por SDS-PAGE y Western blot confirmó la expresión de la proteína híbrida y la conservación del epítipo GST, asegurando que las etapas posteriores de purificación y EMSA se realizaran con la proteína correcta. Estos resultados son consistentes con estudios previos del grupo, en los que ya se había logrado la expresión de MibR, pero sin una caracterización estructural detallada.

Los ensayos de retardo en gel demostraron que MibR es capaz de formar complejos macromoleculares con la región promotora del gen *ipdC*, confirmando de manera directa una interacción y con ello, su participación en la regulación de dicho gen a partir de la disminución en la expresión del gen y en la biosíntesis de AIA observada en cepas mutantes (Reyes-Carmona et al., 2025). En este sentido, se había identificado la presencia de una secuencia palindrómica de 20 pb en la región intergénica de los genes *gltX* e *ipdC* (Vande Broek et al., 2005). La observación de un retardo claro en la movilidad del fragmento de la región promotora, dependiente de la presencia y concentración de MibR, es coherente con el comportamiento típico de reguladores MarR que se unen a secuencias palindrómicas en promotores de genes blanco (Nazaret et al., 2023).

Un aspecto de suma importancia en los EMSA obtenidos es que el incremento en la concentración de MibR produce un único complejo retardado bien definido, cuya intensidad aumenta progresivamente, en lugar de una “escalera” de múltiples complejos con diferentes estados de ocupación. Este patrón coincide con lo descrito para el regulador MarR Rv2887 de *M. tuberculosis*, en el que el complejo proteína–DNA también se visualiza principalmente como una banda desplazada única que se intensifica en función de la concentración proteica (Gao et al., 2017). Esta similitud sugiere que, al igual que Rv2887, MibR estabiliza de forma preferente un estado de unión cooperativo y relativamente homogéneo sobre su región promotora, más que una distribución de especies parcialmente ocupadas fácilmente resolubles en el gel.

Este comportamiento encaja con la lógica de la familia MarR descrita en bacterias asociadas a plantas, donde múltiples reguladores actúan como sensores de señales ambientales y suelen formar complejos bien definidos con sus regiones operador, a menudo en respuesta a compuestos fenólicos o derivados de auxinas exudados por la raíz (Nazaret et al., 2023). En este contexto, la secuencia palindrómica de 20 pb en la región promotora del gen *ipdC* se perfila como un elemento en *cis* de alta afinidad para MibR, análogo a los sitios operador descritos para otros reguladores MarR en sistemas rizosféricos (Nazaret et al., 2023).

10.2 Calidad y validez del modelo estructural de MibR

Dado que no existe una estructura cristalográfica disponible para MibR, el modelado por homología representó una herramienta indispensable para aproximarse a su arquitectura tridimensional. Los reguladores de la familia MarR suelen funcionar como **homodímeros** que reconocen DNA mediante un dominio wHTH conservado (Nazaret et al., 2023), por lo que era razonable asumir esta organización para MibR.

El modelo obtenido en SWISS-MODEL, utilizando como plantilla a la proteína MarR73 de *V. paradoxus* (PDB: 7KF0.1A), presentó una identidad de secuencia de 22.7 % y una cobertura aproximada del 70 %, valores modestos pero característicos para reguladores MarR y suficientes para preservar la arquitectura global del dominio wHTH. Los índices de calidad GMQE y QMEANDisCo se ubicaron en el rango esperado para modelos de resolución intermedia, lo que respalda su uso en análisis comparativos y estudios de acoplamiento molecular (Studer et al., 2020; Waterhouse et al., 2018).

El alineamiento estructural entre MarR73 y MibR mostró una superposición estable, particularmente en las hélices $\alpha 2$ – $\alpha 4$ del dominio regulador y en el lazo asociado a la unión a ligandos, región que en otros reguladores MarR constituye el núcleo del bolsillo de unión. Esta conservación topológica es relevante, ya que estudios estructurales de la familia MarR incluyendo el análisis del mecanismo regulador de Rv2887 mediante cristalografía de rayos X, han demostrado que los ligandos se alojan en cavidades situadas en la interfaz del dímero, desde donde inducen cambios conformacionales que se propagan hacia el dominio de unión a DNA (Gao et al., 2017). La predicción de un estado homodimérico para MibR, tanto en SWISS-MODEL como en los modelos generados por AlphaFold, concuerda con esta lógica estructural.

Paralelamente, el análisis de proteínas homólogas en el genoma de *A. brasilense* Sp7 mediante RAST reveló al menos doce reguladores con dominios wHTH del tipo MarR y longitudes similares (126–178 residuos), lo que refuerza la idea de una red regulatoria compleja en la que MibR sería uno de varios sensores de señales derivadas de la planta. Estos resultados se alinean con lo descrito para bacterias rizosféricas y endofíticas, en las que reguladores MarR coordinan procesos como la degradación de compuestos aromáticos, la respuesta a estrés oxidativo y la expresión de factores de colonización (Nazaret et al., 2023).

10.3 Reconocimiento de la región promotora del gen *ipdC* por la proteína MibR

El modelo tridimensional MibR – DNA generado por AlphaFold 3 permitió explorar con mayor detalle el modo de reconocimiento de la secuencia palindrómica del gen *ipdC*. La disposición de las hélices de reconocimiento del motivo wHTH hacia el surco mayor de la región palindrómica es congruente con lo observado en complejos cristalográficos de otros reguladores tipo MarR, como MexR de *Pseudomonas aeruginosa* (Chen et al., 2010), PcaV de *Streptomyces coelicolor* (Davis et al., 2013) (Kumarevel, et al., 2008) ST1710 de *Sulfolobus tokodaii* (Kumarevel et al., 2008), OhrR de *Bacillus subtilis* (Hong et al., 2005) y Rv2887 de *Mycobacterium tuberculosis* (Gao et al., 2017), así como con el modo de unión inferido para diversos reguladores MarR de *Burkholderia* asociados a factores de virulencia (Gupta et al., 2018). El análisis de puentes de hidrógeno y contactos no covalentes en UCSF Chimera mostró que residuos clave del dominio wHTH de MibR (Gln49A, Ser50A, Asp59A, Thr62A, Arg86A, Tyr88A y Gln14B) establecen una red jerarquizada de interacciones con las bases y el esqueleto fosfato del DNA, concentrándose en las posiciones centrales y en los extremos de la secuencia palindrómica (Figura 15).

Este tipo de interacción es consistente con la función de los reguladores MarR como “lectores” de secuencias palindrómicas. En MibR, la distribución asimétrica de contactos entre las subunidades A y B sugiere un

modelo de dimerización funcionalmente asimétrica, en el que la lectura de bases y la estabilización del complejo se reparten entre ambas subunidades, de forma análoga a lo descrito para otros miembros de la familia MarR.

IO.4 Evidencias estructurales del AIA como ligando alostérico de MibR

Uno de los aportes centrales de este trabajo es el análisis *in vitro* como *in silico* de la posible unión de AIA a MibR. A partir del empalme estructural con MarR73 de *V. paradoxus* y de la búsqueda de cavidades en UCSF Chimera, se identificó un bolsillo hidrofóbico–aromático en la interfaz del dímero como candidato a sitio de unión para AIA, topológicamente equivalente al observado en MarR73. El modelo por homología de MibR, junto con la información estructural de MarR73 cristalizada en complejo con AIA, permitió delimitar una cavidad formada cooperativamente por ambos monómeros del dímero, compatible con un sitio alostérico típico de reguladores de la familia MarR.

En MarR73 (PDB: 7KFO), el AIA se encuentra coordinado por los residuos Ser28, His32, Trp45, Arg46, Ser50 y Val65 (cadena A) y Tyr15, Ala18 (cadena B) distribuidos lo largo del dímero. Estos residuos conforman un bolsillo profundamente hidrofóbico–aromático en la interfaz de las subunidades: Trp45 y Tyr15 apilan con el anillo indólico del AIA, mientras que Ser28, His32 y Arg46 se orientan hacia el grupo carboxilato, formando puentes de hidrógeno y contactos electrostáticos que fijan el ligando; Ala18, Ser50 y Val65 contribuyen al empaquetamiento hidrofóbico y al ajuste de la cavidad. En conjunto, este entorno define un sitio de unión alostérico donde la ocupación por AIA se traduce en cambios conformacionales que disminuyen la afinidad de MarR73 por el DNA (Conway et al., 2022).

En el modelo de MibR de *A. brasilense* Sp7, el análisis de contactos en UCSF Chimera y el *docking* molecular con AIA, realizado en AutoDock/AutoDockTools y posteriormente visualizado en PyMOL para una mejor inspección estructural, predijeron un escenario químicamente análogo. El ligando se acomoda en un bolsillo formado por Leu32.B, Tyr35.B, Arg38.B, Gln41.B y Val42.B de la cadena B, junto con Phe45.A e Ile66.de la cadena A. En esta cavidad, Tyr35.B y Phe45.A enmarcan el anillo indólico mediante interacciones aromáticas, mientras que Leu32.B e Ile66.A refuerzan el carácter hidrofóbico del entorno; Gln41.B y Val42.B actúan como contactos de ajuste fino. De manera destacada, Arg38.B se proyecta hacia el grupo carboxilato del AIA y, en la pose de menor energía, establece dos puentes de hidrógeno con los oxígenos carboxílicos, en contraste con el único contacto sugerido en la búsqueda inicial del bolsillo (Figura I7). Así, aunque la identidad de los residuos difiere entre MarR73 y MibR, en ambos casos se conserva el mismo principio estructural: un núcleo aromático–hidrofóbico que empaqueta el anillo indólico y una “pinza” de residuos cargados/polares que reconocen el carboxilato del AIA en la interfaz del dímero.

Este marco estructural se ve reforzado por la evidencia experimental obtenida en los EMSA con AIA. En primer lugar, la titulación de MibR en ausencia de ligando mostró que, a una concentración aproximada de 325 nM de proteína, el fragmento promotor de *ipdC* (200 ng) se encontraba totalmente desplazado, con desaparición casi completa de la banda libre de DNA y formación de un único complejo retardado bien definido. Esta condición se tomó como referencia para identificar el efecto del AIA en presencia de MibR y el DNA. En presencia de ~22.5 uM de AIA se observó ya una recuperación parcial de la banda libre de DNA y una disminución en la intensidad del complejo MibR–*ipdC*, mientras que a ~45 uM la banda desplazada se redujo notablemente y la fracción de DNA libre se volvió predominante (Figura I3). El control con DMSO (sin AIA) mantuvo un patrón similar al de la condición sin ligando, lo que indica que el efecto

observado depende del AIA y no del solvente. En conjunto, estos resultados sugieren que, a partir de concentraciones micromolares de AIA, MibR pierde progresivamente su capacidad de mantener el promotor de *ipdC* en forma de complejo retardado, en concordancia con un mecanismo alostérico negativo en el que el ligando reduce la afinidad de MibR por su región promotora.

La idea de que AIA funcione como ligando alostérico de un regulador tipo MarR no es exclusiva de MibR ni de MarR73. En *A. baumannii*, Shu et al., en 2015, demostraron que el regulador IacR se une al promotor del operón *iac*, (*iac*HABICDEFX) responsable de la degradación de AIA, y que la adición de AIA desplaza a IacR de su sitio operador, eliminando el corrimiento de banda en EMSA y desreprimiendo la transcripción del operón. De manera análoga, Conway et al. (2022) mostraron que MarR73 en *V. paradoxus* controla el operón *iad* (*iad*ABCDEFGHIJKLMNR), cuya activación permite degradar el exceso de AIA y revertir la inhibición del crecimiento radicular en *Arabidopsis*. En ambos casos, el AIA se comporta como un ligando negativo que, al unirse a un bolsillo alostérico estructuralmente similar al propuesto para MibR, reduce la afinidad del regulador por el DNA.

En nuestro sistema, el patrón observado mostraba una pérdida cooperativa del corrimiento de banda MibR–*ipdC* en presencia de AIA y manteniendo el complejo en el control con DMSO, resultado coherente con este modelo alostérico: donde el AIA crearía un cambio conformacional, donde esta nueva estructura tendría una menor afinidad por la región promotora de *ipdC*. A diferencia de IacR, que actúa sobre un operón de degradación de AIA y se asocia a un modo de unión multimérico sobre una región de ~63 pb, MibR parece funcionar como un homodímero asimétrico sobre una secuencia palindrómica más corta (20 pb) y asociado a la biosíntesis de AIA a través de *ipdC*, más que a su catabolismo. Esta interpretación se sustenta en los datos previos de Reyes Carmona et al., 2025 y Jijón Moreno 2017, donde las cepas de la doble mutante *A. brasilense* 2115 ($\Delta libR::Km^R$, $\Delta mibR::Gm^R$) presentan una disminución significativa en la acumulación de AIA cuantificada por HPLC, acompañada de una menor expresión del gen *ipdC* determinada por RT-qPCR, en comparación con la cepa silvestre. Si MibR regulara principalmente un operón de degradación de AIA, la pérdida del regulador debería producir el efecto opuesto (mayor acumulación de AIA), por lo que la evidencia disponible apunta a un papel predominante de MibR en la vía biosintética del AIA dependiente del gen *ipdC* (Reyes Carmona, et al., 2025; Jijón-Moreno, 2017) más que a su catabolismo (Shu et al., 2015; Conway et al., 2022).

Esta comparación sugiere que el principio regulatorio MarR–AIA–DNA descrito originalmente en contextos de degradación de auxinas (IacR, MarR73) pudo haberse reutilizado evolutivamente en *A. brasilense* para coordinar la producción de AIA en respuesta a señales de la rizosfera. El hecho de que el bolsillo de unión propuesto para MibR comparta la misma lógica arquitectónica que el sitio cristalográficamente resuelto en MarR73, que el *docking* molecular señale a Arg38.B como residuo ancla del AIA y que los EMSA muestren una disminución de la unión MibR–*ipdC* en presencia de AIA, refuerza la plausibilidad de MibR como un sensor alostérico de auxinas dentro de la red de reguladores MarR-like de *A. brasilense* Sp7.

10.5 Modelo funcional de regulación del gen *ipdC* por la proteína MibR y perspectivas

Integrando los resultados experimentales y los análisis *in silico*, es probable que MibR actúe como regulador negativo del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7. En ausencia de AIA, MibR se uniría a la secuencia palindrómica de la región promotora, ocupando el operador e impidiendo el acceso de la maquinaria transcripcional y, posiblemente, de otros reguladores como LibR, un regulador propuesto como positivo en la transcripción del gen *ipdC*. Conforme avanza el crecimiento bacteriano y aumenta la concentración de AIA en el entorno rizosférico, el ligando se uniría al bolsillo alostérico de MibR, estabilizado especialmente por Arg38.B y otros residuos polares y aromáticos. Este evento desencadenaría un cambio conformacional que reduciría la afinidad de MibR por el DNA, favoreciendo su disociación del promotor y permitiendo la activación del gen *ipdC*. Este modelo es consistente con la lógica regulatoria descrita para otros miembros de la familia MarR en bacterias asociadas a plantas, donde la unión de metabolitos derivados del hospedero incluyendo compuestos fenólicos y auxinas modula la unión del regulador al DNA y ajusta la expresión de genes implicados en la colonización de la rizosfera, la degradación de compuestos aromáticos o la respuesta a estrés (Nazaret et al., 2023). En particular, el paralelismo con IacR en *A. baumannii* (Shu et al., 2015) y la analogía estructural con Rv2887 (Gao et al., 2017) refuerzan la idea de que MibR se inserta en un marco regulatorio conservado, pero adaptado al contexto específico de *A. brasilense*, donde la producción de AIA tiene un papel clave en la promoción del crecimiento vegetal.

No obstante, a lo aquí presentado, es importante reconocer las limitaciones del presente estudio. En primer lugar, los ensayos con AIA en EMSA deben consolidarse con análisis cuantitativos más finos (curvas de titulación, determinación de K_d aparente) y, en lo ideal, con técnicas complementarias como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) o la resonancia de plasmones de superficie (SPR), que permitan medir directamente la afinidad de MibR por el ligando y por el DNA. En segundo lugar, el modelo estructural y el *docking* asumen un dímero relativamente rígido; simulaciones de dinámica molecular podrían ayudar a explorar la propagación de cambios conformacionales desde el bolsillo de unión hacia el dominio wHTH, como se ha hecho en otros reguladores MarR. Finalmente, queda por dilucidarse cómo se integra la acción de MibR con la de otros reguladores MarR presentes en el genoma de *A. brasilense* y con factores específicos de la rizosfera, como exudados radiculares y variaciones en la disponibilidad de nutrientes (Nazaret et al., 2023).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis consolidan a MibR como un regulador clave en la vía de biosíntesis de AIA a través de la regulación del gen *ipdC* y aportan un marco estructural comparativo con otros reguladores MarR (Rv2887, IacR) que permitirá diseñar experimentos dirigidos, como mutagénesis de residuos del bolsillo de unión (por ejemplo, Arg38.B o Tyr88.A) y la evaluación de análogos de AIA. Más allá del caso particular de *A. brasilense* Sp7, este estudio contribuye a la comprensión de cómo las bacterias promotoras del crecimiento vegetal integran señales hormonales de la planta mediante reguladores MarR-like, ajustando su fisiología para optimizar la colonización y la interacción benéfica en la rizosfera (Gao et al., 2017; Nazaret et al., 2023; Shu et al., 2015).

II. CONCLUSIÓN

En conjunto, este trabajo posiciona a MibR como un nodo regulador clave en la vía de biosíntesis de AIA mediada por el gen *ipdC*. A nivel experimental, se comprobó que MibR se une a la región promotora de *ipdC* y que la adición de AIA provoca una pérdida progresiva del corrimiento de banda en EMSA, lo que indica que esta fitohormona actúa como un ligando alostérico negativo que reduce la afinidad de MibR por su región promotora.

Los análisis *in silico* del complejo MibR–*ipdC*–AIA apoyan este modelo funcional: el homodímero de MibR reconoce una región palindrómica en el promotor de *ipdC* mediante su dominio wHTH, mientras que AIA se acomoda en un bolsillo alostérico estabilizado por residuos polares y aromáticos (por ejemplo, Arg38.B y Tyr88.A), favoreciendo un cambio conformacional que debilita la unión al DNA.

Adicionalmente, la búsqueda de proteínas homólogas en el genoma de *A. brasilense* Sp7 reveló varios reguladores tipo MarR con dominios wHTH conservados y porcentajes de identidad compatibles con la diversidad propia de esta familia. El modelado tridimensional de estos homólogos sugiere que MibR forma parte de una red más amplia de reguladores MarR en *A. brasilense* Sp7, lo que abre la posibilidad de que existan circuitos adicionales de respuesta a AIA u otras señales derivadas de la rizosfera.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis consolidan a MibR como un regulador clave en la vía de biosíntesis de AIA a través de la regulación del gen *ipdC* y ofrecen un marco estructural y funcional comparativo con otros reguladores MarR (Rv2887, IacR, MarR73) que permitirá diseñar experimentos dirigidos, como la mutagénesis de residuos del bolsillo alostérico y el análisis de variantes del promotor de *ipdC*, así como estudios de dinámica molecular y técnicas biofísicas (ITC, SPR) para cuantificar la afinidad de MibR por el DNA y por AIA. Más allá del caso particular de *A. brasilense* Sp7, estos resultados contribuyen a comprender cómo las bacterias promotoras del crecimiento vegetal integran señales hormonales de la planta mediante reguladores tipo MarR, ajustando su fisiología para optimizar la colonización y la interacción benéfica en la rizosfera.

12. REFERENCIAS

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., . . . Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500.
- Baksh, K., & Zamble, D. (2020). Allosteric control of metal-responsive transcriptional regulators in bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 295(6), 1673–1684.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., . . . Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242.
- Bez, C., Covaceuszach, S., Bertani, I., Choudhary, K., & Venturi, V. (2021). LuxR Solos from Environmental Fluorescent Pseudomonads. *mSphere*, 6(2).
- BIOVIA, Dassault Systèmes. (2025). *Discovery Studio Visualizer (Version 2025)*. Dassault Systèmes.
- Carreño-Lopez, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., & Baca, B. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular & general genetics : MGG*, 264(4), 521–530.
- Chapter 6 - *Azospirillum*. (2020). In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, & A. Sankaranarayanan, *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 73–105). Amsterdam, United States of America: Academic Press.
- Chen, H., Yi, C., Zhang, J., Zhang, W., Ge, Z., Yang, C. G., & He, C. (2010). Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO reports*, 11, 685–690.
- Conway, J. M., Walton, W. G., Salas-González, I., Law, T. F., Lindberg, C. A., Crook, L. E., . . . Dangl, J. L. (2022). Diverse MarR bacterial regulators of auxin catabolism in the plant microbiome. *Nature microbiology*, 7, 1817–1833.
- Davis, J. R., Brown, B. L., Page, R., & Sello, J. (2013). Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic acids research*, 41, 3888–3900.
- Donati, A., Lee, H., Leveau, J., & Chang, W. (2013). Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One*, 8, 1-11.
- Duca, D., & Glick, B. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(20), 8607–8619.
- Duca, D., Rose, D., & Glick, B. (2018). Indole acetic acid overproduction transformants of the rhizobacterium *Pseudomonas* sp. UW4. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(9), 1645–1660.
- Fukami, J., Abrantes, J., Del Cerro, P., Nogueira, M., Ollero, F., 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.
- Gao, Y. R., Li, D. F., Fleming, J., Liu, Y., Deng, J. Y., Zhou, L., . . . Bi, L. J. (2017). Structural analysis of the regulatory mechanism of MarR protein Rv2887 in *M. tuberculosis*. *Scientific reports*, 7, 6471.
- Glick, B. (2020). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. (Second ed.). Springer, Heidelberg.
- Gupta, A., Pande, A., Sabrin, A., Thapa, S. S., Gioe, B. W., & Grove, A. (2018). MarR Family Transcription Factors from Burkholderia Species: Hidden Clues to Control of Virulence-Associated Genes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 83, e00039-18.
- Herrera-Galindo, J., Alcántara-Rosales, C. A., Ojeda Jr., O. M., Xiqui-Vázquez, M. L., Mancilla-Simbro, C., Reyes-Carmona, S., . . . Ramírez-Mata, A. (2025). Inactivation of cysteine synthase CysK-A enhances flocculation, biofilm formation, and sensitivity to oxidative stress in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Biofilm*.
- Hong, M., Fuangthong, M., Helmann, J. D., & Brennan, R. G. (2005). Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Molecular cell*, 20, 131–141.
- 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*. Tesis doctoral, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, Puebla.
- Kumarevel, T., Tanaka, T., Nishio, M., Gopinath, S. C., Takio, K., Shinkai, A., . . . Yokoyama, S. (2008). Crystal structure of the MarR family regulatory protein, ST1710, from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Journal of structural biology*, 161, 9–17.
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic acids research*, 49(D1), D458–D460.
- Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature communications*, 13(1), 836.
- Malhotra, M., & Srivastava, S. (2008). Organization of the ipdC region regulates IAA levels in different *Azospirillum brasilense* strains: molecular and functional analysis of ipdC in strain SM. *Environmental microbiology*, 10(5), 1365–1373.
- Molina, R., Rivera, D., Mora, V., López, G., Rosas, S., Spaepen, S., . . . Cassán, F. (2018). Regulation of IAA Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* Under Environmental Stress Conditions. *Current microbiology*, 75(10), 1408–1418.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K.,Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Nazaret, F., Alloing, G., Mandon, K., & Frendo, P. (2023). MarR Family Transcriptional Regulators and Their Roles in Plant-Interacting Bacteria. *Microorganisms*, 11(8).
- Pantigoso, H., Newberger, D., & Vivanco, J. (2022). The rhizosphere microbiome: Plant-microbial interactions for resource acquisition. *Journal of applied microbiology*, 135(5), 2864–2876.
- Paque, S., & Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC biology*, 14(1), 67.
- Patten, C., Blakney, A., & Coulson, T. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 395–415.
- Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microb Ecol*, 61, 723–728.
- Reyes-Carmona, S., Jijón Moreno, S., Ramírez-Mata, A., Xiqui Vázquez, M., & Eugenia Baca, B. (2025). MibR and LibR are involved in the transcriptional regulation of the ipdC gene in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Research in Microbiology*, 176(5-6).
- Schrödinger, LLC. (2015). *Citing PyMOL*. Retrieved from PyMOL by Schrödinger: <https://pymol.org/support.html#citing>
- Shu, H. Y., Lin, L. C., Lin, T. K., Chen, H. P., Yang, H. H., Peng, K. C., & Lin, G. H. (2015). Transcriptional regulation of the iac locus from *Acinetobacter baumannii* by the phytohormone indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 1237–1247.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., . . . Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7, 539.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6), 1102–1104.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36, 1765–1771.
- Tang, J., Li, Y., Zhang, L., Mu, J., Jiang, Y., Fu, H., & Zhang, Y. (2023). Biosynthetic Pathways and Functions of Indole-3-Acetic Acid in Microorganisms. *Microorganisms*, 11(8).
- Tarrand, J. J., Krieg, N. R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian journal of*

- microbiology*, 24, 967–980.
- Vadakkan, K., Choudhury, 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.
- 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.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., . . . Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, 46, W296–W303.
- Will, W., & Fang, F. (2020). The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. *Current opinion in microbiology*, 55, 1–8.
- Xoco Quintero, S. (2023). *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 de maestría, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Centro De Investigación En Ciencias Microbiológicas, Puebla.
- 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.
- Yañez Meza, J. L. (2022). *Purificación de la proteína MibR de Azospirillum brasilense Sp7 y búsqueda de proteínas homólogas*. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Posgrado en Ciencias Microbiológicas.

