



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS

Posgrado en Ciencias Microbiológicas

TESIS

“Purificación de la proteína MibR de *A. brasilense* Sp7 y  
búsqueda de proteínas homólogas”.

para obtener el título de

Maestra en ciencias

PRESENTA:

Biol. Jessica Larisa Yañez Meza

ASESOR DE TESIS:

D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona

Puebla, Puebla

abril 2022



Puebla, Pue. a 21 de abril 2022.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Jessica Larisa Yáñez Meza**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Purificación de la proteína MibR de *A. brasilense* Sp7 y búsqueda de proteínas homólogas"**

A nuestro juicio, la alumna **Jessica Larisa Yáñez Meza** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Beatriz Eugenia Baca

D.C. Alberto Ramirez Mata

D.C. Miguel Castañeda Luján

D.C. Lucía Soto Urzúa



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres Tere y Enrique por enseñarme tanto, por darme las herramientas completas para ponerme metas en la vida y cumplir mis sueños, les agradezco por cuidarme tanto, por amarme tanto, por enseñarme el camino para seguir mi vida por mi cuenta sin cortarme nunca las ganas de hacer todo lo siempre quise, gracias por toda su dedicación, por sus regaños, sé que todas sus palabras siempre han nacido desde su amor de padres y por ende, siempre me han ayudado a continuar fuerte en mi camino en esta vida. Gracias por su lucha para lograr que yo pudiera llegar hasta el día de hoy, gracias también a mi hermano Christopher por siempre escucharme y alentarme, por todo su amor y su preocupación. Los amo, soy muy afortunada de tenerlos como familia.

Agradezco a mi Tutora Sandra Reyes por su paciencia y todo el empeño que puso para formarme y trabajar conmigo de la mano para que el día de mi graduación llegara. Le agradezco sus enseñanzas y su bello humor. Se que elegí a una maravillosa mentora porque no es común para nada encontrar a alguien como usted, tan comprometida, paciente y con ese interés genuino en ayudar y estar con sus alumnos. Gracias por escucharme, gracias por todo.

Gracias al doctor Alberto Ramírez Mata por ser también mi mentor, por las bromas y su gran ayuda siempre al discutir mi trabajo, por guiarme también en el uso de tantas herramientas para mi formación académica. Le agradezco a la QFB. Ma. Luisa Xiqui Vázquez por su apoyo en los experimentos y las experiencias compartidas. También agradezco mucho al doctor Julio Lenin Dominguez Ramirez, del departamento de Ciencias Químico Biológicas en la Escuela de Ciencias de la Universidad de las Américas Puebla, por ser tan bella persona, un gran investigador e interesarse por ayudarme a pesar de no ser su alumna directa para conocer más sobre el mundo que es la bioinformática, he sido afortunada en conocerlo y aprender tanto de usted doctor.

Le agradezco a la doctora Beatriz Eugenia Baca por sus enseñanzas, su experiencia y dedicación en la formación de sus alumnos y su pensamiento crítico, estoy feliz de haberla conocido en el breve tiempo que pude trabajar en el laboratorio debido a la pandemia, ha sido una grata experiencia haberla escuchado ser tan directa siempre con todos y tan comprometida.

Le agradezco al doctor Miguel Castañeda Lucio por apoyarme siempre en mi desarrollo académico, por enseñarme tanto desde la licenciatura y por ser ahora mi sinodal. Usted fue mi primer contacto con el hacer de la ciencia, así como la pasión por esta misma y le estoy eternamente agradecida doc.

Gracias a mis profesores de la maestría por desarrollar mi pensamiento crítico y sus enseñanzas, gracias a mis amigos del laboratorio vecino Ara, Lili, Emmanuel, Diana, Migue, Emmanuel y Paco por las lindas platicas y los momentos amenos, también agradezco a mis manitos David, Uriel y Nain por esas comidas tan buenas y tantas risas, a mis amigas Ale y Eli por ser tan bellas personas, tan ocurrentes y humanas, sé que cuento con ustedes siempre, gracias a Lolita, Flor, Alejandro, Michelle y Suemy por la retroalimentación y convivencia. También agradezco a mis compañeros del laboratorio interacción bacteria planta por sus enseñanzas y disposición para apoyarme siempre. A Dany e Iván por su ayuda siempre que la pedí, a Richi por el buen humor, a Paco por las pláticas tan amenas del Choche de bronco que me hacían reír mucho aunque tuviera estrés y a mi bella amiga Ibelith quien me escuchó y animó siempre que lo necesité.

Gracias a mi novio Uriel por apoyarme y mostrarme siempre diferentes perspectivas para ser una mejor versión de mí, gracias amor. Agradezco a mis amigos de la licenciatura Lili, Fernando, Fers y Angie por siempre animarme, apoyarme y darme esos momentos tan bellos que me ayudaron a continuar con mis estudios, por ser mis maestros.

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la BUAP, a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) y al Instituto de Ciencias (ICUAP) por formarme y darme la gran oportunidad de estudiar mi posgrado, así también agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por darme el impulso económico para seguir adelante con mi maestría y cumplir mi sueño, estoy muy agradecida.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AIA:** ácido indol acético.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**AuxRE:** Elemento de respuesta a auxinas.

**Clustal Omega:** Plataforma para hacer alineamientos múltiples.

**GenBank:** Banco de genomas.

**HTH:** hélice-vuelta-hélice.

**IAN:** Vía del indol-3-acetonitrilo.

**IAM:** Vía de la indol-3-acetamida.

***ipdC*:** Gen codificante de la indol-piruvato- descarboxilasa.

**IPTG:** isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido.

**IPyA:** Vía del ácido indol-3-pirúvico.

**I-TASSER:** Servidor para la predicción de funciones y estructura de las proteínas.

**LibR:** Regulador de la biosíntesis de AIA del tipo MarR.

**LPSN:** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature.

**LuxR:** Regulador Lux.

**MarR:** Regulador de resistencia a múltiples antibióticos.

**MibR:** Regulador de la biosíntesis de AIA del tipo MarR.

**MPM:** Marcador de peso molecular.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PGPR:** Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

**RAST:** Anotación rápida usando tecnología de subsistemas.

**REC:** Dominio Receptor homólogo de Che-Y.

**SMART:** Herramienta de investigación de arquitectura modular simple.

**SWISS MODEL:** Servidor para el modelado de proteínas por homología.

**TyR:** Regulador de Tirosina.

**UCSF CHIMERA:** Programa para la visualización interactiva de estructuras moleculares.

## Contenido

RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
Biología de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	11
El ácido indol acético como molécula señal en <i>A. brasilense</i> .....	11
Síntesis de AIA en <i>Azospirillum spp.</i> .....	13
Vía del indol-3-acetonitrilo (IAN) .....	13
Vía de la indol-3-acetamida (IAM) .....	13
Vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA) .....	13
El gen <i>ipdC</i> y la síntesis de AIA .....	14
LibR como miembro de la familia de reguladores transcripcionales LuxR .....	17
La proteína MibR como miembro de la familia de reguladores transcripcionales MarR .....	19
El papel de las proteínas MibR y LibR en la regulación del gen <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> Sp7 .....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
JUSTIFICACIÓN .....	25
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVO GENERAL .....	26
OBJETIVOS PARTICULARES .....	26
MÉTODOS .....	27
Construcción pGEXGST- <i>mibR</i> .....	27
Condiciones de cultivo .....	27
Inducción de la cepa <i>E. coli</i> BL21- <i>mibR</i> .....	27
Lisis bacteriana .....	27
SDS-PAGE .....	28
Purificación de la proteína. ....	28
Cuantificación de la proteína. ....	28
Análisis bioinformáticos .....	28
RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	32
Inducción de la expresión de la proteína MibR-GST .....	32
Purificación de la proteína MibR-GST. ....	32
Purificación de la etiqueta protéica GST .....	33
RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS .....	34
Proteína MibR .....	34
Identificación de proteínas homólogas a MibR .....	37
Análisis estructural de las proteínas CouR, BpsR y PcaV vs MibR .....	41

Búsqueda de genes codificantes para proteínas homólogas a MibR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	45
Identificación de miembros de la familia MarR en <i>A. brasilense ssp</i> y otros géneros bacterianos. .....	55
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES .....	75
PERSPECTIVAS .....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas con mayor similitud estructural con la proteína MibR presentes en PDB.....	37
<b>Tabla 2.</b> Proteínas homólogas a MibR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp7.....	45
<b>Tabla 3.</b> Contexto genético de genes homólogos de la proteína MibR en el genoma de <i>A. brasilense</i> Sp 7.....	48
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de las proteínas MarR de acuerdo con su rol fisiológico.....	55
<b>Tabla 5.</b> Funciones asociadas a miembros de la familia MarR.....	57
<b>Tabla 6.</b> Proteínas de la familia MarR y sus ligandos.....	59
<b>Tabla 7.</b> Proteínas de la familia MarR, sus ligandos y su sitio de unión.....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rutas de síntesis de AIA en bacterias.....	13
<b>Figura 2.</b> Contexto genético de <i>ipdC</i> .....	14
<b>Figura 3.</b> SDS- PAGE que muestra 4 proteínas que se unen al promotor de <i>ipdC</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> Dominios y estructura que conforma a la proteína LibR de <i>A. brasilense</i> Sp 7.....	17
<b>Figura 5.</b> Dominios y estructura que conforma a la proteína MibR de <i>A. brasilense</i> Sp 7.....	19
<b>Figura 6.</b> Nivel de expresión del gen <i>ipdC</i> en las mutantes libR, mibR y doble, con respecto a la cepa silvestre Sp7 crecidas en MMAB con malato.....	20
<b>Figura 7.</b> Producción de AIA por cepas de <i>A. brasilense</i> Sp7 en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento.....	20
<b>Figura 8.</b> Modelo propuesto de la participación de las proteínas MibR y LibR en la regulación de la transcripción del gen <i>ipdC</i> en <i>A. brasilense</i> sp7 .....	22
<b>Figura 9.</b> Inducción de la proteína MibR-GST a diferentes temperaturas.....	31
<b>Figura 10.</b> Proteína MibR-GST purificada.....	32
<b>Figura 11.</b> Inducción y purificación de la proteína GS.....	33
<b>Figura 12.</b> Estructura de la proteína MibR (WP_051140036.1) de <i>A. brasilense</i> sp7.....	34
<b>Figura 13.</b> Dominio HTH de la proteína MibR de <i>A. brasilense</i> sp7.....	35
<b>Figura 14.</b> Modelo tridimensional del homodímero de MibR.....	36
<b>Figura 15.</b> Alineamiento del dominio HTH entre MibR y las 10 proteínas más parecidas a ella según su estructura terciaria en la plataforma I-TASSER.....	39
<b>Figura 16.</b> Alineamiento HTH entre los 3 miembros de la familia MarR más parecidos estructuralmente a MibR. ....	40
<b>Figura 17.</b> Alineamiento de la proteína MibR y PcaV.....	41
<b>Figura 18.</b> Alineamiento de la proteína MibR y CouR.....	43
<b>Figura 19.</b> Empalme de estructuras entre MibR y BpsR. ....	44
<b>Figura 20.</b> Alineamiento de la secuencia proteica de MibR y proteínas MarR encontradas en el genoma de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7.....	51
<b>Figura 21.</b> Proteínas identificadas en la búsqueda bibliográfica.....	54
<b>Figura 22.</b> Ligandos de las proteínas de la familia MarR.....	60

## RESUMEN

*A. brasilense* es una bacteria clasificada como PGPR (rizobacteria promotora del crecimiento vegetal), la cual se caracteriza por producir compuestos que le permiten interactuar con las raíces de las plantas promoviendo de esta forma su crecimiento. Dentro de los compuestos mayoritariamente producidos por la bacteria se encuentra la auxina ácido indol 3 acético (AIA), una hormona vegetal capaz de regular procesos fisiológicos importantes tanto en la bacteria como en las plantas con las que interactúa, esto a través de efectos directos o indirectos. En *Azospirillum*, existen diferentes vías de biosíntesis del AIA, siendo la principal, aquella en la que participa la enzima indol piruvato descarboxilasa codificada por el gen *ipdC*. Si bien se conocen factores ambientales que regulan la biosíntesis del AIA, existen muy pocos estudios sobre los mecanismos de regulación a nivel transcripcional de este gen. En el laboratorio de la interacción bacteria planta, a través de ensayos de cromatografía de afinidad y MALDI-TOF se identificó en *A. brasilense* Sp7 la presencia de dos proteínas unidas a la región promotora denominadas como LibR y MibR. Mutantes de los genes que codifican para estas proteínas provocó una disminución en la cantidad de AIA producido, así como en el nivel de expresión del gen *ipdC*. El presente trabajo constituye un acercamiento a la biología de la proteína MibR. En la parte experimental, se establecieron las condiciones de purificación de la proteína y por otro lado, se realizaron análisis *in silico* en los cuales se generó un modelo tridimensional de la proteína MibR la cual consistente de 6  $\alpha$ -hélices y 2  $\beta$ -plegadas con un dominio HTH que va del aminoácido 50 al 150. Debido a que esta proteína forma parte de la familia MarR, y a través de la plataforma I-TASSER se identificaron tres proteínas de otros géneros bacterianos con la que se comparte una identidad entre el 23 y el 31%, sin que exista a la fecha cristales de proteínas de esta familia en *Azospirillum*. Además, de identificar en el genoma 15 proteínas más de la familia MarR. A través de una búsqueda bibliográfica de miembros de esta familia, se encontró que la mayoría (20) son represores de la transcripción, cinco son activadores y sólo dos poseen función dual. Todas poseen únicamente 3 tipos de plegamiento (6  $\sigma$ -hélices y 2  $\beta$ - plegadas, 6  $\sigma$ -hélices y 3  $\beta$ - plegadas o 7  $\sigma$ -hélices y 3  $\beta$ - plegadas). La mayoría de estas proteínas poseen ligandos aromáticos que se unen utilizando puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals.

## INTRODUCCIÓN

### Biología de *Azospirillum brasilense*

El género *Azospirillum* pertenece a la familia de las *Rhodospirillaceas*, que incluye a las  $\alpha$ -proteobacterias de forma bacilar con flagelos peritricos, aerobias, catalasa y oxidasa positivas que son capaces de utilizar varias fuentes de carbono como: glucosa, lactato, succinato, fructosa, malato, piruvato y fumarato (Zhou *et al.*, 2009). Dicho género abarca 28 especies (de acuerdo con el sitio LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature), [www.bacterio.net/azospirillum.html](http://www.bacterio.net/azospirillum.html), fecha de consulta: 2021) dentro de las cuales, *A. brasilense* destaca por ser una de las más estudiadas.

*Azospirillum brasilense* posee hasta 7 replicones, su genoma va de los 6.7 a 7.6 mega bases y exhibe un contenido de G+C de 68% (Wisniewski *et al.*, 2012). Esta bacteria forma parte de un grupo de organismos conocido como PGPRs (rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta) dada su capacidad para la fijación de nitrógeno en asociación con las raíces (Steenhoudt y Vanderleyden 2000), así como la producción de hormonas importantes para el crecimiento, tales como las auxinas, cuya producción es la más importante en términos cuantitativos (Zimmer y Bothe 1988).

Las auxinas son compuestos que influyen en el desarrollo de las plantas, el crecimiento y la formación de raíces, además, su uso es rutinario en la industria agrícola para el crecimiento de cultivos vegetales *in vitro* y en plantaciones. Dentro de este grupo, la auxina natural más importante es el ácido indol acético (AIA) (Patten y Glick 1996; Castillo *et al.*, 2005).

### El ácido indol acético como molécula señal en *A. brasilense*

El AIA regula procesos relacionados con el crecimiento de las plantas en diferentes estadios de su desarrollo tales como: embriogénesis, organogénesis de raíces (Benková *et al.*, 2003), desarrollo del tejido vascular (Mattsson *et al.*, 2003), senescencia, la interacción planta-patógeno (Kazan y Manners, 2009) y la respuesta al estrés abiótico (Wang *et al.*, 2010), entre otros. Con respecto a los procesos del desarrollo, el AIA participa en el mecanismo de transporte de auxinas de célula a célula en respuesta a señales ambientales (Kepynski y

Leyser, 2005, Teale *et al.*, 2006), también siendo importante para la generación de los meristemas primarios y auxiliares (Weijers y Jurgens, 2005). Por otro lado, se conoce que el AIA en plantas es capaz de regular diferentes genes, los cuales incluso poseen sus propios factores de transcripción inducidos por auxinas (Abel y Theologis, 1996).

El AIA también puede ser producido por una amplia variedad de bacterias desde aquellas que viven en el suelo, hasta marinas, endófitas y cianobacterias entre otras (Sergeeva *et al.*, 2002). En estas bacterias AIA participa en diferentes procesos de su fisiología, por ejemplo: en la respuesta a estrés, en la producción de biopelícula y exopolisacáridos en *Bradyrhizobium japonicum* y *Escherichia coli* (Donati *et al.*, 2013; Bianco *et al.*, 2006). También puede actuar como factor de virulencia en organismos como *Agrobacterium tumefaciens* en donde funge como inductor de tumores en plantas, sin embargo, en la mayoría de los casos, esta molécula actúa como uno de los mecanismos con los que las bacterias son capaces de asociarse con las plantas de manera mutualista promoviendo con ello su crecimiento, tal es el caso de rizobacterias como *A. brasilense* (Thomashow *et al.*, 1984).

El AIA funciona como molécula señal en rizobacterias al permitir la expresión de genes que participan en procesos de catabolismo e incluso en la síntesis del mismo (Donati *et al.*, 2013; Puyvelde *et al.*, 2011). Este último hecho se ha demostrado en mutantes productoras de ínfimas cantidades de AIA de *B. japonicum* y *A. baldaniorum*, en las cuales esta molécula actúa como inductor, provocando una disminución en la expresión de 39 genes de proteínas ribosomales, mientras que se promueve un aumento en la expresión de otros genes, entre los que aparece la enzima indol piruvato ferredoxin oxidoreductasa que se sugiere, podría estar implicada en el metabolismo de AIA en otros modelos bacterianos (Mai *et al.*, 1994; Bianco *et al.*, 2009; Puyvelde *et al.*, 2011; Donati *et al.*, 2013). En *A. brasilense* Sp 7, esta molécula regula la expresión del gen *ipdC* que participa en la síntesis del mismo metabolito (Van de Broek *et al.*, 1999; Malhotra y Srivastava, 2008)

## Síntesis de AIA en *Azospirillum spp.*

La producción de dicho metabolito en las bacterias depende del pH, la oxigenación, la concentración de su precursor triptófano en el medio y la fase de crecimiento (Omay *et al.*, 1993). Específicamente, *A. brasilense* produce 24 µg/ml de AIA en medio con fuente de nitrógeno y triptófano; hecho que le ayuda a mantener también su interacción con las raíces de las plantas (Jijón *et al.*, 2017).

A través del uso de técnicas de biología molecular, se ha identificado la existencia de 4 vías encargadas de la síntesis de AIA en *A. brasilense* dependientes de triptófano: la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), la vía del indol 3-acetonitrilo (IAN), la vía de la indol-3-acetamina y la vía de la triptamina, así como una vía independiente de triptofano (Prinsen *et al.*, 1993, Costacurta & Vanderleyden, 1995, Carreño-López *et al.*, 2000, Duca & Glick, 2020).

### Vía del indol-3-acetonitrilo (IAN)

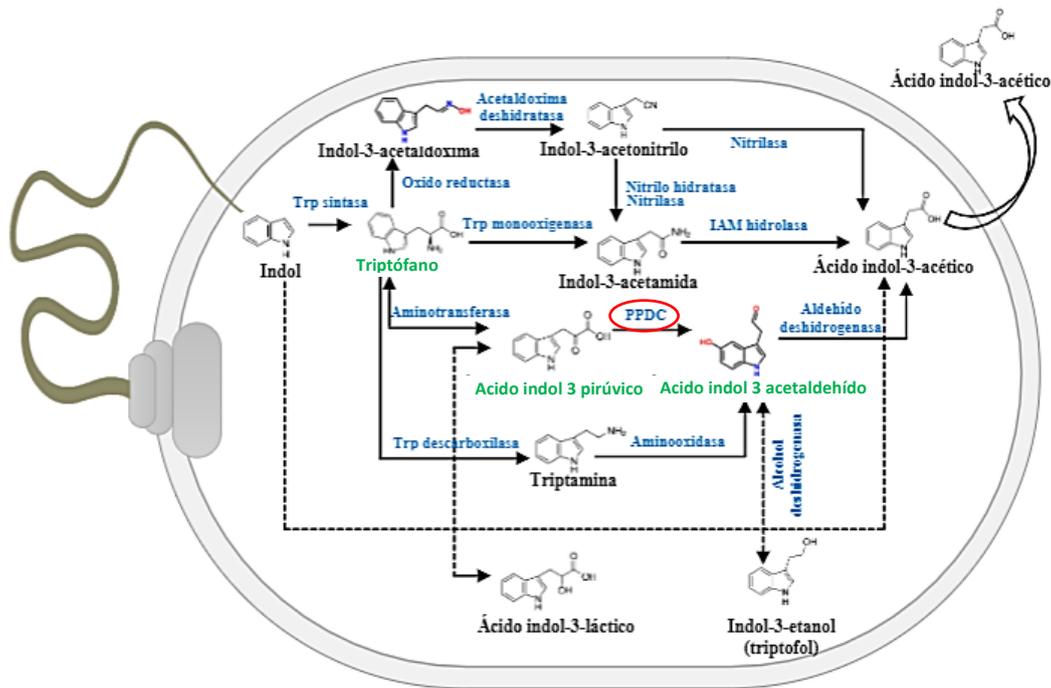
El indol 3 acetonitrilo es sintetizado en dos vías: en la primera, la actividad nitrilasa lo deshidrata para generar indol 3 acetamida y ésta se transforma en AIA gracias a una acetamida hidrolasa. Mientras en la segunda puede transformarse directamente en AIA mediante la acción de una nitrilasa (Patten *et al.*, 2012; Idiris *et al.*, 2007) (Figura 1).

### Vía de la indol-3-acetamida (IAM)

El Trp es transformado en indol 3 acetamida por la acción de dos enzimas, una monooxigenasa y una indol acetamida hidrolasa que lo convierte en AIA (Pollmann *et al.*, 2006) (Figura 1).

### Vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA)

La vía del ácido indol -3- piruvato (IPyA) es considerada como la más importante. Esta ruta se divide en tres etapas: primero, el precursor triptófano es transformado en ácido indol-3-piruvico mediante una aminotransferasa, luego, ocurre una descarboxilación que conlleva a la formación del indol-3-acetaldehido por la enzima indol piruvato descarboxilasa y finalmente, es oxidado por una deshidrogenasa para formar AIA (Spaepen *et al.*, 2008) (Figura 1).



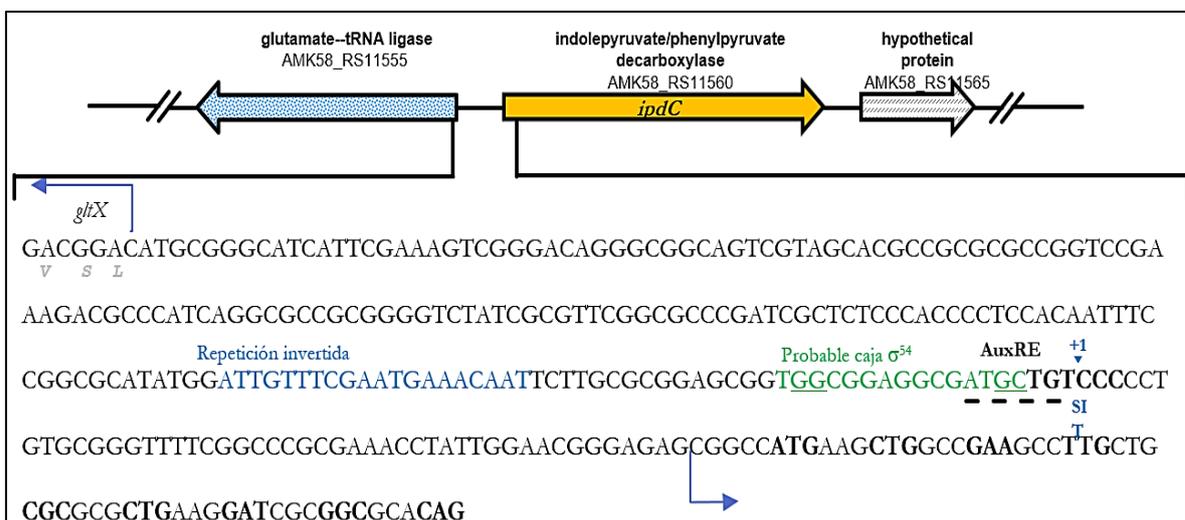
**Figura 1. Rutas de síntesis de AIA en bacterias.** En color verde se señala la vía IPyA a la que pertenece la enzima PPDC resaltada en el círculo rojo (Imagen obtenida de la modificación de Jijón, 2017).

### El gen *ipdC* y la síntesis de AIA

La enzima indol piruvato descarboxilasa, codificada por el gen *ipdC*, es considerada como la más importante para la ruta biosintética del AIA debido a que las mutaciones generadas en los homólogos de *ipdC*, dentro del género *Azospirillum* provocan la disminución de más del 50% en la producción de AIA (Spaepen *et al.*, 2008). Específicamente en *A. brasilense* Sp7, la mutación de *ipdC* deriva en una disminución del 75% del metabolito de interés en comparación con la cepa silvestre. Mientras que en *A. brasilense* Sp 245 (*A. baldaniorum*), el gen de interés contribuye con el 90% de la producción de AIA (Carreño *et al.*, 2000; Malhotra y Srivastava, 2008).

Estudios *in silico* realizados en *A. brasilense* Sp 245 mostraron que el gen *ipdC*, se encuentra flanqueado por los genes *iaaC* y *gltX*, en donde el primero codifica para la proteína *iaaC* inhibidora de la síntesis de AIA (Malhotra y Srivastava, 2008), y el segundo una glutamato tRNA ligasa (Vande Broek *et al.*, 2005, Rothballer *et al.*, 2005); hecho del que se destaca que existe una transcripción conjunta de los genes *iaaC* e *ipdC* aunque ambos poseen su promotor propio (Vande Broek *et al.*, 2005).

El gen *ipdC* de *A. brasilense* Sp7 (no. de acceso en GenBank AMK58\_RS11560) tiene una longitud de 1,638 pb y se encuentra de forma divergente al gen *gliX* (AMK58\_RS11555), el cual codifica para una proteasa dependiente de ATP. Entre estos dos genes se encuentra una región intergénica de 250pb, la cual presenta distintos elementos en cis que resultan interesantes en el estudio de la regulación de este gen, entre ellos se observa un sitio de unión a ribosoma, un probable sitio de unión a  $\sigma^{54}$ , una secuencia denominada “elemento de respuesta a auxinas” (AuxRE), que en plantas resulta esencial para la activación del promotor y que además es inducida por AIA (Vande Broek *et al.*, 2005; Jijón, 2017): y, finalmente, una secuencia palindrómica de 20 nucleótidos, que sugiere su posible papel en la unión de elementos en trans que pudieran intervenir en la regulación de dicho gen (Figura. 2).



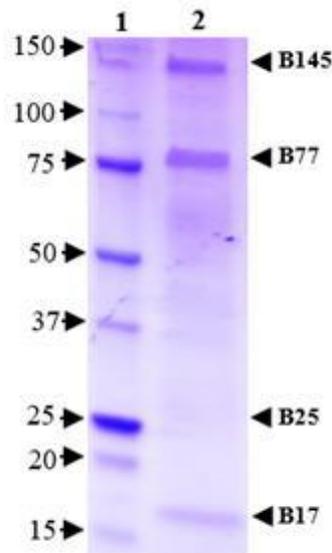
**Figura 2. Contexto genético de *ipdC*.** Se amplía la región intergénica del gen *ipdC* en donde se observan sus elementos en cis (Jijón, 2017).

La transcripción del gen *ipdC*, se ve afectada por factores como: la formación de biopelícula en organismos emparentados con *Azospirillum* (Hamilton *et al.*, 2009), mientras que en *A. brasilense* Sp7 esta se ve potenciada conforme el aumento de la densidad celular, alcanzando su máximo en la fase estacionaria; hecho que coincide con la acumulación de AIA en el medio. Además, se ha demostrado que la expresión del mismo, también incrementa al adicionar AIA y otras auxinas sintéticas exógenas al medio de cultivo; aunque no lo hace con la adición de triptófano (Trp) (Carreño *et al.*, 2000). También se ha observado la participación de proteínas en trans como TyrR la cual se sabe que participa como

regulador positivo del gen *ipdC* en *Enterobacter cloacae* UW5 (Ryu y Patten, 2008) mientras que en otros organismos como *E.coli*, regula la transcripción de genes implicados también en el metabolismo de aminoácidos aromáticos (Pittard *et al.*, 2005).

### **Antecedentes directos**

En el laboratorio de interacción bacteria planta, Jijón en 2017 comenzó a estudiar la regulación genética del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7 a través del análisis de la posible participación del regulador transcripcional *tyrR* el cual se había hipotetizado, podría estar involucrado en su regulación genética, sin embargo, al construir una cepa mutada en el gen *tyrR*, ésta no ejerció ningún efecto o cambio en la transcripción del gen *ipdC*. Debido a este hecho, se llevó a cabo un análisis más detallado de la secuencia de la secuencia invertida encontrada dentro de la región promotora del gen *ipdC*; para ello, se realizó un ensayo de cromatografía de afinidad utilizando la región promotora del gen marcado con biotina y puesto a interactuar con un extracto proteico de *A. brasilense* Sp7 crecido previamente en un medio MMAD con malato y triptófano (100ug/ml). Los resultados se observaron en un gel SDS-PAGE en el que se ven cuatro proteínas con los tamaños de: 155.3, 73.8, 56.5 y 18.2 kDa (Figura 3) las cuales, al ser analizadas por MALDI-TOF fueron identificadas como: la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, una poliribonucleótido nucleotidiltransferasa y reguladores transcripcionales de las familias LuxR y MarR. Para fines del estudio, estas últimas fueron nombradas como LibR (**L**uxR-like indole-3-acetic acid **b**iosynthesis **r**egulator) y MibR (**M**arR-like indole-3-acetic acid **b**iosynthesis **r**egulator). Una de las características más notables de éstas dos proteínas es la presencia de dominios de unión a DNA del tipo hélice-vuelta-hélice; hecho que apoyó su posible papel como reguladores transcripcionales del gen *ipdC*, así como su posible participación en la síntesis de AIA en la bacteria (Jijón, 2017).



**Figura 3. SDS- PAGE que muestra 4 proteínas que se unen a la región promotora del gen *ipdC*.** Las proteínas identificadas por cromatografía de afinidad tienen un peso aproximado de: 155.3, 73.8, 56.5 y 18.2 kDa. (Obtenido de Jijón, 2017).

## LibR como miembro de la familia de reguladores transcripcionales LuxR

Los miembros de esta familia fueron descritos por primera vez en *Vibrio fischeri* como reguladores de la transcripción de genes de bioluminiscencia, además, se sabe que estos reguladores se encuentran implicados en el sistema de señalización de “quorum sensing” en gran parte de bacterias Gram (–) como *P. aeruginosa*, *V. fischeri* y *A. tumefaciens*, modelos en los que los reguladores de esta familia se unen al ADN mediante la estimulación de su sitio autoinductor. Los miembros de esta familia de reguladores poseen un dominio REC, que generalmente es distintivo de los reguladores de sistemas de doble componente (Galperin, 2006) en los cuales, señales del entorno son detectadas por una cinasa histidínica que fosforila al dominio REC de su regulador de respuesta induciendo un cambio conformacional en dicho regulador favoreciendo o impidiendo su unión a secuencias específicas de ADN (Plate y Marletta, 2013; Jijón, 2017).

Jijón en 2017 determinó que el gen *libR*, posee 645pb y se encuentra dentro del plásmido ABSP7\_P1 de *A. brasilense* Sp7, este se encuentra flanqueado por una posible acil-CoA deshidrogenasa y una posible inosina 5 monofosfato deshidrogenasa, contexto que comparte con otros miembros del género



## La proteína MibR como miembro de la familia de reguladores transcripcionales MarR

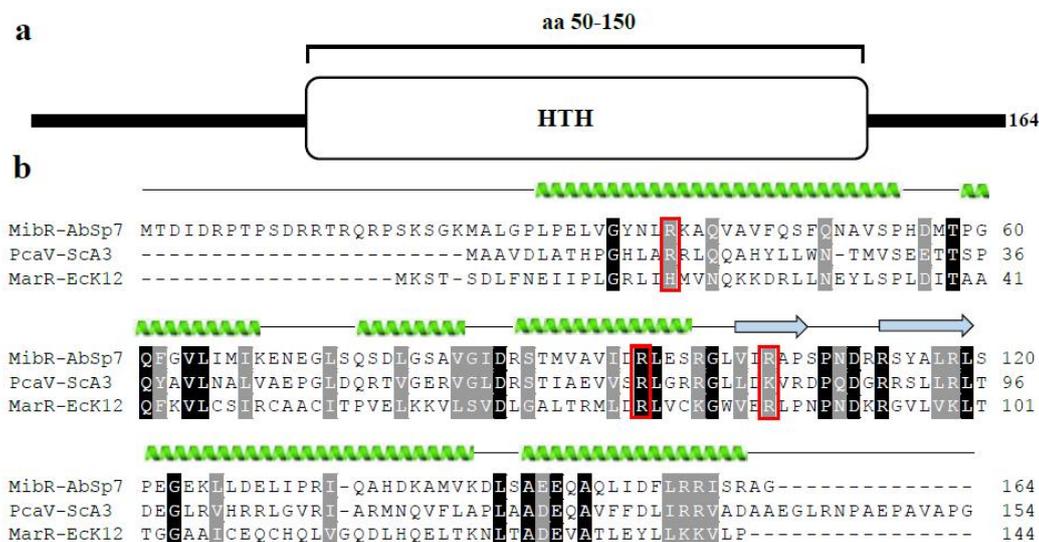
Los reguladores de esta familia fueron descritos en *E. coli* como reguladores de la transcripción dentro del proceso de resistencia a múltiples antibióticos, se encuentran distribuidos en bacterias y arqueas actuando como activadores o inhibidores de la transcripción al unirse a regiones palindrómicas de 16 a 20pb (Perera y Grove, 2010) aunque su unión también puede darse en secuencias degeneradas, hecho por el cual no se le ha establecido una secuencia de unión específica (Rouanet *et al.*, 2004). Aunado a esto, se sabe que las secuencias de unión suelen posicionarse cercanas o sobrelapadas con el promotor, por lo que la unión con el regulador termina bloqueando el acceso de la ARN polimerasa, represión conocida como impedimento estérico, uno de los mecanismos más comunes de represión en bacterias (Martin *et al.*, 1995).

Una característica importante de la mayoría de los reguladores transcripcionales MarR es que requieren de la unión a ligandos específicos que les permiten la asociación o disociación con el ADN para modular la expresión génica. Algunos de estos ligandos pueden ser metabolitos derivados de las mismas vías biosintéticas que son a su vez reguladas por el mismo regulador transcripcional al que se unen (Zhu *et al.*, 2013).

El AIA en bacterias puede mediar la expresión de genes actuando como ligando de reguladores de la transcripción de las familias MarR, participando en el catabolismo de AIA al inactivar genes que regulan la biosíntesis del mismo metabolito y también en los que controlan el catabolismo de AIA mediante la unión directa con estos, sin embargo, dicha unión también puede inhibirse al añadir AIA, de manera que el regulador pierde la capacidad de unirse con el ADN (Shu *et al.*, 2015).

Por su parte, el gen *mibR*, fue encontrado en el cromosoma de *A. brasilense* Sp7 así como en otros miembros del género *Azospirillum*. Este gen posee 495pb y codifica para una proteína de 164 a.a. con masa molecular de 18.2KDa. Esta, de acuerdo con estudios bioinformáticos utilizando la plataforma SMART, se sabe que posee un solo dominio HTH (Figura 5a) y su estructura terciaria, arrojada

por la plataforma Phyre2, es de 6 alfa hélices y 2 beta plegadas (Figura 5b) (Jijón, 2017).



**Figura 5. Dominios y estructura que conforma a la proteína MibR de *A. brasilense* Sp 7.** a) Dominio HTH presente en MibR. b) Estructura primaria y terciaria de la proteína en donde las espirales verdes representan las alfas hélices y las flechas son las betas plegadas. En el alineamiento se incluye a PcaV de *Streptomyces coelicolor* y MarR de *Escherichia coli*. (Tomado de Jijón 2017).

## El papel de las proteínas MibR y LibR en la regulación del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7

Jijón en 2017, obtuvo mutantes de los genes *libR* y *mibR*, presentes en el plásmido 1 y cromosoma respectivamente, así como una mutante en ambos genes. Estas mutantes fueron denominadas como  $\Delta libR::Km^R$  en el caso de la mutante *libR*,  $\Delta mibR::Km^R$  en el caso de la mutante *mibR* y  $\Delta libR::Km^R \Delta mibR::Gm^R$  en el caso de la mutante doble. Posteriormente, fueron evaluadas en ensayos de RT-qPCR para identificar el efecto sobre la expresión del gen *ipdC*. Los resultados mostraron que, en presencia de triptófano, la expresión del gen *ipdC* disminuyó 5 veces en la mutante del gen *libR*, mientras que en la mutante del gen *mibR* la disminución no fue estadísticamente significativa, sin embargo, eliminar ambos genes derivó en la disminución de la expresión del gen *ipdC* en un orden de 7 veces con respecto a la cepa silvestre (Figura 6) (Jijón, 2017).

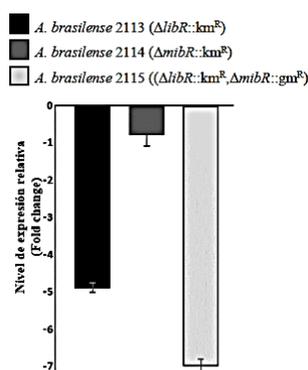


Figura 6. Nivel de expresión del gen *ipdC* en las mutantes *libR*, *mibR* y doble mutante con respecto a la cepa silvestre Sp7 crecidas en MMAB con malato (Jijón, 2017).

En el mismo trabajo, se confirmó la participación de los reguladores MibR y LibR en la producción de AIA, al determinar la cantidad producida del metabolito por las 3 mutantes mediante HPLC; no observándose algún cambio significativo para la mutante en *mibR* a comparación de la cepa silvestre. Mientras que la producción se ve claramente alterada para las mutantes en *libR* y la doble mutante, con una disminución de 31% y 51%, respectivamente (Figura 7).

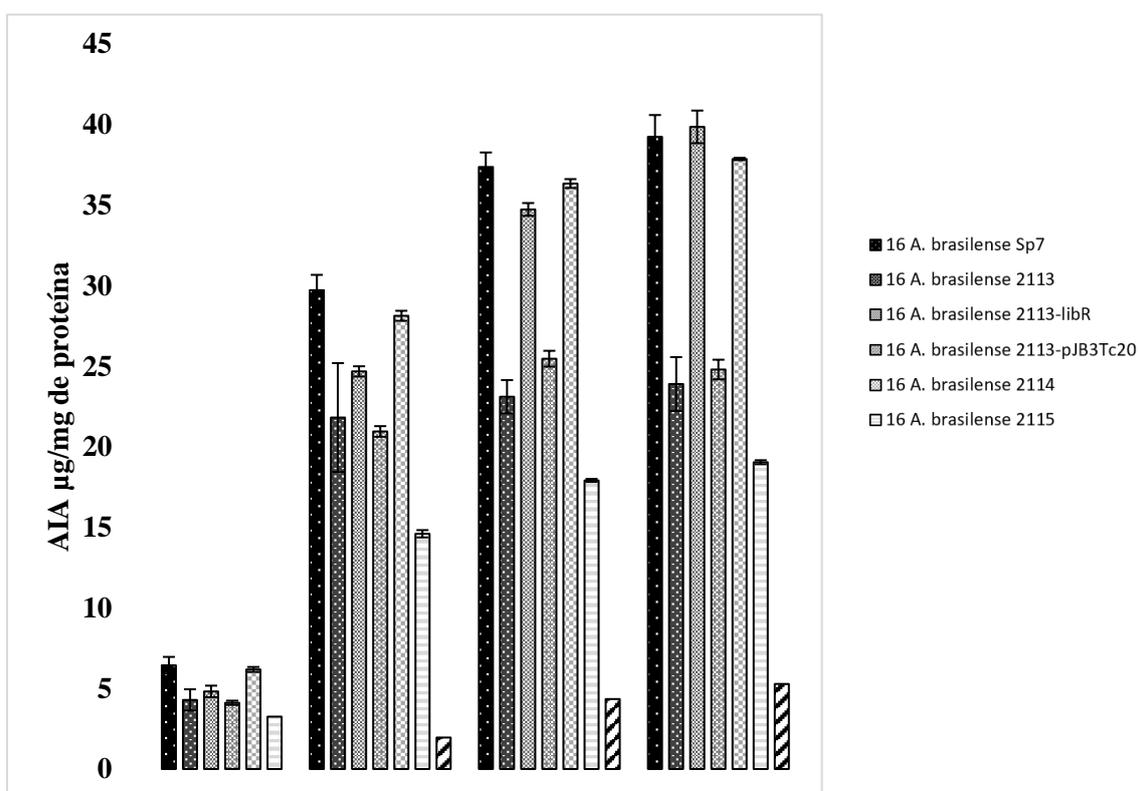


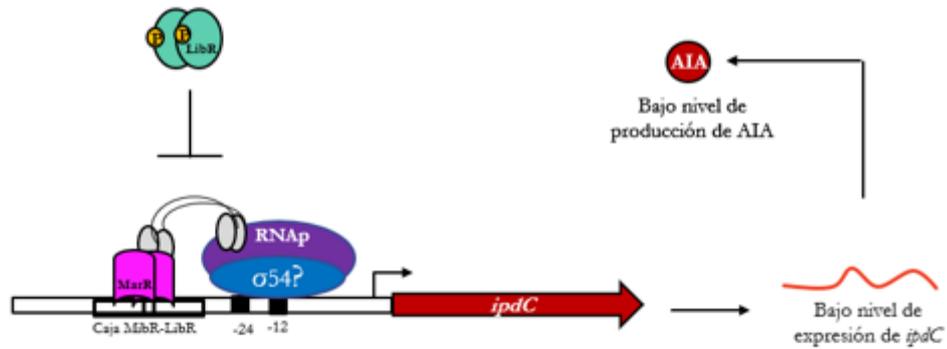
Figura 7. Producción de AIA por cepas de *A. brasilense* Sp7 en MMAB con malato a diferentes tiempos de crecimiento (Tomado de Jijón, 2017).

Derivado de los resultados obtenidos por Jijón en 2017, se sabe que las proteínas LibR y MibR podrían fungir como reguladores de la transcripción del gen *ipdC*. De esta manera, se ha propuesto que ambos reguladores podrían competir por el sitio de unión al promotor *ipdC* en respuesta a señales intra o extracelulares aún desconocidas.

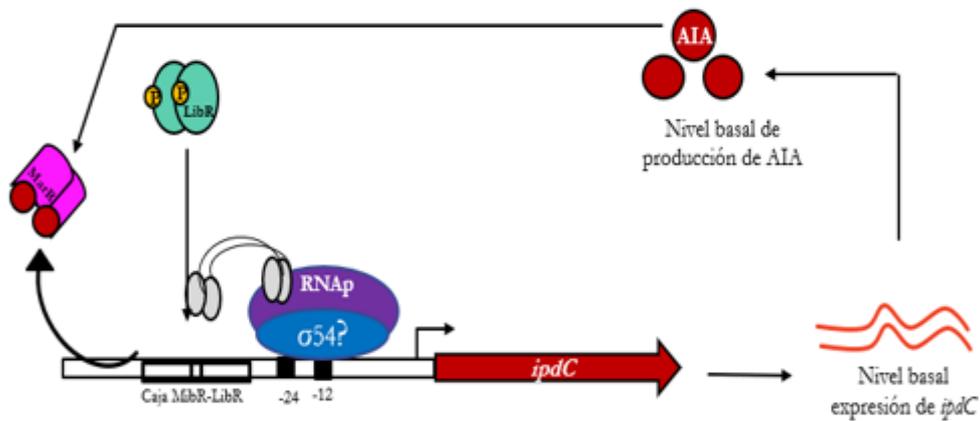
En el laboratorio de interacción bacteria planta se propuso un modelo hipotético para describir la regulación mediada por las proteínas MibR y LibR con base en las características propias de cada miembro. En este modelo se sugiere que, durante la fase exponencial de crecimiento de *A. brasilense* Sp7, MibR se une al promotor en ausencia de AIA activando la expresión del gen *ipdC* en bajos niveles. Estos niveles de expresión pudieran deberse a que esta proteína no interactúa de manera adecuada con el factor sigma debido a que carece del dominio de unión  $\sigma^{54}$  para activar en gran medida la tasa de expresión (Figura 8a). Al inicio de la biosíntesis de AIA en esta fase, el aumento en la concentración de este metabolito permite su unión a MibR, lo que deriva en un cambio conformacional que hace a este regulador disociarse de la región promotora, permitiendo así la unión de LibR en su estado fosforilado (Figura 8b), logrando que éste interactúe físicamente con el factor  $\sigma^{54}$  activando la expresión de *ipdC* a una mayor tasa cuando la densidad celular alcanza la fase estacionaria de crecimiento (Figura 8c) (Jijón, 2017).

Los resultados obtenidos previamente por Jijón en 2017, han generado gran información respecto a la participación de las proteínas MibR y LibR en la regulación transcripcional del gen *ipdC* en *Azospirillum brasilense* Sp7, por lo que en el presente trabajo, nos centramos en la purificación de la proteína MibR para en un futuro ser utilizada en ensayos de retardo electroforético, que permitan poner a prueba la interacción de esta proteína con la región intergénica de *ipdC*. Así mismo, se hizo uso de herramientas bioinformáticas que permitieran obtener más información con respecto a la naturaleza de la proteína MibR.

a) Fase exponencial temprana de crecimiento



b) Fase exponencial tardía de crecimiento



c) Fase estacionaria de crecimiento

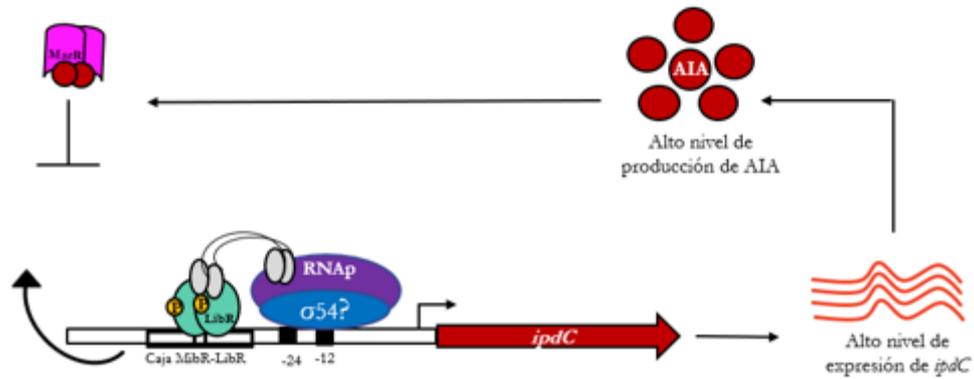


Figura 8. Modelo propuesto de la participación de las proteínas MibR y LibR en la regulación de la transcripción del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7. a) Fase exponencial temprana, b) fase exponencial tardía y c) fase estacionaria del crecimiento (Jijón 2017).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ácido indol acético es una de las fitohormonas de mayor relevancia debido a su papel en el desarrollo y crecimiento de las plantas. A la fecha se conocen diversos factores ambientales que regulan la expresión de esta fitohormona, sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en la regulación transcripcional del gen *ipdC* el cual codifica para la enzima indol piruvato descarboxilasa, que dentro de la vía IPyA, es considerada la enzima principal en la biosíntesis de esta fitohormona. En este sentido, la región promotora del gen *ipdC* contiene distintos elementos que podrían participar en su regulación, de entre los que destaca una secuencia palindrómica repetida, la cual sugiere la participación de elementos en trans, como la proteína MibR. Esta proteína ha demostrado participar en la regulación de la expresión del gen *ipdC*, debido a que la mutante por eliminación del gen *mibR* mostró una disminución de la biosíntesis del AIA, así como de la expresión del gen *ipdC*. Con base en estos datos, es necesario identificar el mecanismo por el cual esta proteína participa en la regulación transcripcional del gen *ipdC*. MibR pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR, los cuales requieren de la unión a un ligando para llevar a cabo su función, por lo cual en el Laboratorio de Interacción bacteria planta se ha propuesto que AIA pudiera unirse a MibR y así participar en su regulación, sin embargo, esta posibilidad aún debe explorarse. Finalmente, es necesario realizar ensayos que nos permitan poner a prueba la interacción entre la región promotora y MibR, para lo cual se requiere purificar a la proteína MibR en grandes cantidades.

## JUSTIFICACIÓN

Durante mucho tiempo, el estudio de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (conocidas como PGPR), ha resultado ser de enorme interés debido a los múltiples beneficios que genera su inoculación en las raíces de las plantas. Dentro de estos beneficios, la producción de fitohormonas como el ácido indol acético ha tomado gran relevancia por su papel en la agroecología. Debido a lo anterior, en este trabajo se propone ampliar el conocimiento respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la biosíntesis de AIA, desde el punto de vista de la regulación transcripcional del gen *ipdC* y la participación de una proteína con posible función de regulador de la transcripción. En este sentido, se requiere contar con mayor información respecto a la naturaleza proteica de MibR a través de su análisis con herramientas bioinformáticas, que sugieran mecanismos de acción y nos permitan apoyar el modelo de acción propuesto para MibR y su interacción con elementos presentes en el promotor del gen *ipdC*.

## HIPÓTESIS

La proteína MibR participa en la regulación del gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp7 a través de su interacción con ácido indól acético (AIA).

## OBJETIVO GENERAL

Ampliar la información sobre la participación de la proteína MibR en la regulación de la expresión del gen *ipdC* de *Azospirillum brasilense* Sp7.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones de purificación de la proteína MibR.
- Analizar el contexto genético del gen *mibR* e identificar genes que codifiquen proteínas homólogas putativas.
- Realizar docking molecular entre la proteína MibR y AIA.
- Identificar funciones, mecanismos de acción, conformación y ligandos de miembros de la familia MarR en *A. brasilense* Sp7 y otros géneros bacterianos.

## MÉTODOS

### Construcción pGEXGST-*mibR*

La construcción pGEXGST-*mibR* está constituida por la secuencia codificante de *mibR* (495pb) en el vector de expresión pGEXGST (5460pb), de tal manera que se obtiene la proteína de fusión GST-MibR (GST fusionada al extremo N-terminal de MibR) con un peso aproximado de 43 KDa. Esta construcción esta albergada en *E.coli* BL21 para generar cultivos que permitan expresar a la proteína para su posterior purificación (Jijón 2017).

### Condiciones de cultivo

La cepa *E. coli* BL21-*mibR* fue sembrada a partir de un stock en glicerol en placas de LB con 100ug/ml de ampicilina (amp) y se dejó en incubación a 37° durante la noche. A partir de las colonias presentes, se seleccionó una para realizar un precultivo en 5 ml de LB con 100ug/ml de amp y se dejó a 37° toda la noche a 150rpm. Al día siguiente, se tomó un volumen de 250 ul y se colocaron en 25 ml de LB complementado con 100ug/ml de ampicilina y se incubó a 37° con 150 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}=0.5$ .

### Inducción de la cepa *E. coli* BL21-*mibR*

Para generar la inducción de la expresión de la proteína MibR-GST, se agregó al cultivo isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a una concentración final de 0.1mM durante 3 horas a 150 rpm. La inducción se realizó en tres diferentes temperaturas: 16°, 30° y 37°. En estos ensayos, se consideraron controles que consistieron en cultivos de la cepa BL21-*mibR* a los cuales no se les colocó IPTG, de tal manera que permitieran comparar los resultados entre las cepas inducidas y no, para identificar la correcta inducción.

### Lisis bacteriana

Los paquetes celulares se obtuvieron al colocar los cultivos en tubos cónicos, centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min y eliminar el medio. Dichos paquetes se resuspendieron en buffer de lisis (Tris/NaCl 50mM, EDTA 5mM, PMSF 0.15mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 1mM), se incubaron en hielo 10 min y se procedió a sonicar

3 ciclos de encendido y apagado de 15" cada uno a una amplitud del 40%. El lisado celular se observó al microscopio para corroborar que la lisis se hubiese realizado correctamente. Finalmente, se centrifugó 15 min a 4° a 12,000rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml y la pastilla se descartó.

## SDS-PAGE

Se hicieron geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% para observar a la proteína GST-MibR la cual tiene un peso aproximado de 43 KDa. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie de acuerdo a Schägger (2006), en una proporción 1:1 de buffer de carga con las muestras.

## Purificación de la proteína.

Utilizando 200 ul de perlas de agarosa glutatión en proporción 1:1 con su buffer de almacenamiento en la columna de afinidad, se agregó un mililitro de PBS buffer 1X para equilibrar la resina (3X), posteriormente, se agregó el extracto protéico obtenido, el cual después de pasar por la resina fue colectado (extracto total no unido). Se realizaron lavados con 1.5 de PBS 1X cada uno. Finalmente, se realizaron eluciones de la proteína de interés con buffer de elución (10 mM glutatión reducido en 50 mM de Tris-HCl pH 8.0). La purificación se realizó para la proteína GST-MibR y para el control de GST sola.

## Cuantificación de la proteína.

La proteína fue cuantificada utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Análisis bioinformáticos

### **I-TASSER** (Iterative Threading **ASSE**mblly **Refinement**)

La plataforma I-TASSER se utilizó para generar el modelo tridimensional de la proteína MibR en su forma de monómero. La plataforma en línea I-TASSER predice estructuras y funciones de proteínas, generando modelos tridimensionales de alta calidad a partir de secuencias de aminoácidos. Los resultados consisten en deducciones a partir de un consenso con las mejores

coincidencias estructurales de modelos preexistentes en bases de datos. En esta plataforma se toman en cuenta distintos valores: C-Score, que indica que tan bueno es el modelo generado de acuerdo con su similitud con las plantillas de referencia. Este valor va de -5 a 2, y entre más cercano sea el valor a 2, indica que es más parecido a las plantillas, y por lo tanto tiene mayor validez. RMSD: Este valor indica el grado de desviación que tiene la posición de los átomos del modelo generado contra el o los modelos de referencia, entre más cercano a 0 el modelo presentará menos desviación de distancia entre los átomos del modelo usado como plantilla y el modelo generado por homología. TM-score: Indica la similitud entre la estructura generada y la estructura de referencia, entre más cercano es el valor a 1, el parecido será mayor. [I-TASSER server for protein structure and function prediction \(zhanggroup.org\)](http://I-TASSER_server_for_protein_structure_and_function_prediction_(zhanggroup.org))

## **SWISS-MODEL**

Esta plataforma se utilizó para generar el modelo de homodímero de MibR ya que SWISS-MODEL es una plataforma que predice la estructura de una secuencia de aminoácidos por modelado por homología, permitiendo analizar la calidad de la estructura generada, prediciendo la probable función que posee la proteína de interés e incluso predecir la posible interacción al ligando con base en la plantilla utilizada. Las resoluciones de los distintos cristales disponibles se encuentran en rangos que indican la calidad: Muy buen cristal (1-2 Å), buen cristal (2.0–2.5 Å), cristal aceptable (2.5 – 3.0 Å) y cristal no tan confiable (3 Å o mayor), de tal manera que los cristales a utilizar como plantilla son los que presenten menor valor de Å. Así mismo, en esta plataforma se debe tener en cuenta, que la plantilla debe de contar con un mínimo del 25% de identidad con respecto a la secuencia que estamos trabajando, por lo que a mayor sea éste, es mejor. De los modelos que se proporcionan se eligió aquel que tuviera los valores GMQE y QMEANDisco más cercanos a 1, que determinan la calidad de la estructura. [SWISS-MODEL \(expasy.org\)](http://SWISS-MODEL_(expasy.org))

## UCSF CHIMERA

Es un programa extensible para la visualización interactiva y el análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, incluidos mapas de densidad, ensamblajes supramoleculares, alineaciones de secuencias, resultados de acoplamiento, trayectorias y conjuntos conformacionales. Se pueden crear imágenes y películas de alta calidad. A partir de ello, se lograron observar y resaltar áreas relevantes de cada modelo de la proteína MibR. [UCSF Chimera Home Page](#)

## CLUSTAL OMEGA

Consiste en una plataforma en línea que permite una alineación de secuencias múltiples de tres o más secuencias juntas, obteniendo resultados eficientes y precisos. El “Clustal Consensus” (última línea del alineamiento), incluye alguno de los siguientes caracteres: a) Asterisco (\*); indica que en dicha posición los residuos son 100% idénticos, b) dos puntos (:); indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservativas y c) punto (.); indica sustituciones menos conservativas. [Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI](#)

## MULTIPLE ALING SHOW

Esta plataforma utiliza alineamientos múltiples obtenidos en otros programas, con el objetivo de resaltar la conservación y/o similitud de residuos. Esta plataforma permite establecer el porcentaje de identidad que se busca, a la cual se le asigna un color determinado para su identificación. [Multiple Align Show \(bioinformatics.org\)](#)

## RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)

Para analizar el contexto genético de la proteína MibR, así como la búsqueda de las proteínas homólogas a MibR en *A. brasilense* Sp7, se utilizó la plataforma RAST, a partir del genoma completo cargado previamente en dicha plataforma por miembros del laboratorio de interacción bacteria-planta. RAST permite realizar una anotación rápida y automatizada de genomas de bacterias basada en una tecnología de subsistemas, asignando un posible rol funcional a cada uno

de los genes anotados de acuerdo a su propia matriz de datos. [RAST Server - RAST Annotation Server \(nmpdr.org\)](#)

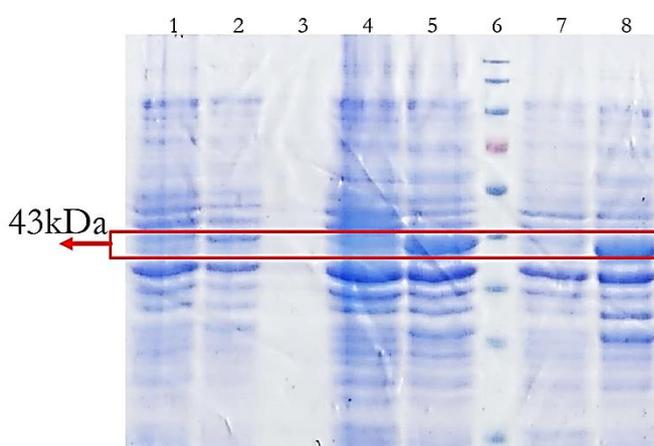
**SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)**

Permite la identificación y anotación de dominios y el análisis de arquitecturas de los mismos. Estos dominios están ampliamente anotados con respecto a las distribuciones filogenéticas, la clase funcional, las estructuras terciarias y los residuos funcionalmente importantes. Cada dominio del SMART se identifica mediante un número de acceso único, lo que proporciona referencias estables para otras bases de datos de dominios y está vinculado a los dominios correspondientes en Pfam y PROSITE. [SMART: Main page \(embl.de\)](#)

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

### Inducción de la expresión de la proteína MibR-GST

Para establecer las mejores condiciones de inducción en la expresión de la proteína MibR-GST, se colocó 0.1 mM de IPTG a los cultivos y después de tres horas de incubación se realizó un SDS-PAGE para observar la temperatura a la que se obtenía una mayor expresión. Los resultados mostraron que a 30° y 37° se dan las mejores condiciones de inducción (Figura 9).



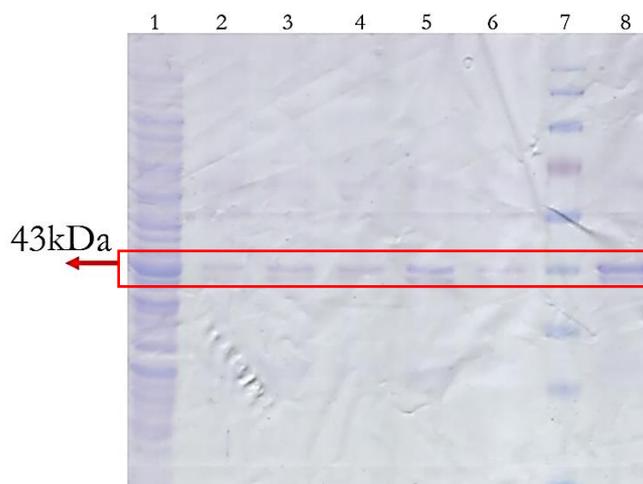
**Figura 9. Análisis por SDS PAGE al 10% de la inducción de la proteína MibR-GST a temperaturas de 30° y 37°.** En el carril 1 se encuentra el control sin inducir a 16°, en el carril 2 la inducción a 16°, los carriles 4 y 5 corresponden con el control y la inducción respectivamente a 30°, mientras que los carriles 8 y 9 son el control y la inducción a 37°. En el carril 6 se observa el marcador de peso molecular (Biorad).

Se optó por utilizar la inducción a 30° dada la facilidad que representa esta condición para el uso de las incubadoras del laboratorio.

### Purificación de la proteína MibR-GST.

La purificación de la proteína MibR-GST se realizó a través de columnas de afinidad empleando perlas de agarosa acopladas a glutatión como se describe en material y métodos. En la imagen 11 se muestra el análisis en SDS-PAGE, en donde se observa en el carril 1 el extracto proteico que no se unió a las perlas, en el carril 2 al 6 se muestran cinco eluidos en donde es evidente la presencia de una doble banda en el tamaño aproximado de 43 KDa, que corresponde al peso molecular esperado, siendo el eluido 5 el que contiene una mayor cantidad de la proteína purificada. En el carril 8 se observa la proteína que aún está unida

a las perlas y la cual no fue eluida. En el carril 7 se muestra el marcador de peso molecular.



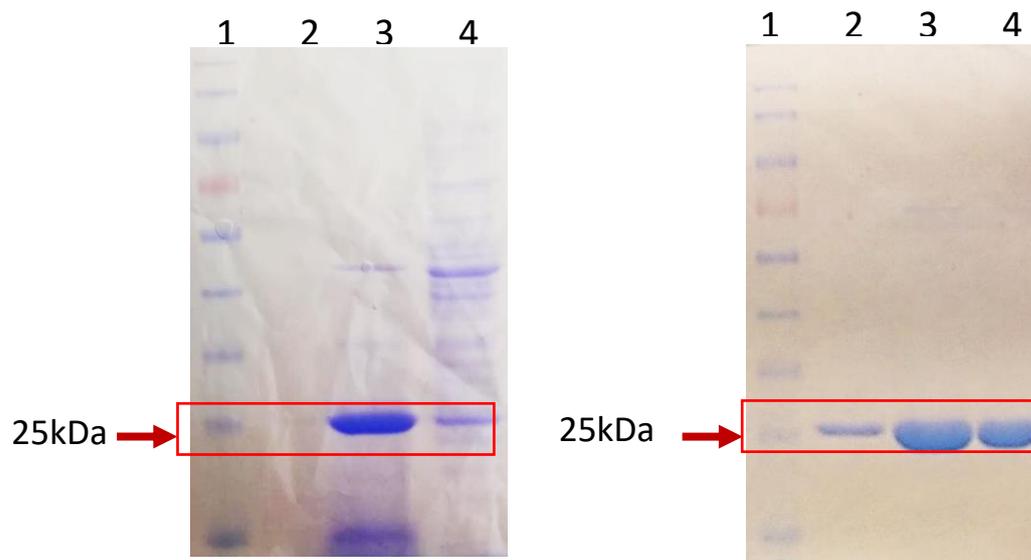
**Figura 10. Proteína MibR-GST.** Carril 1: Extracto no unido a perlas. Carril 2-6: Eluciones con glutatión reducido. Carril 7: marcador de peso molecular (Biorad). Carril 8: perlas.

Una vez purificada la proteína, se procedió a cuantificar obteniéndose en un primer ensayo un total de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Las condiciones de purificación de la proteína MibR-GST identificadas en este trabajo, serán utilizadas en un futuro para realizar ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), que permita comprobar la interacción de la proteína MibR a la región promotora del gen *ipdC*.

### Purificación de la etiqueta protéica GST

Con la idea de realizar posteriormente ensayos de EMSA, se usó el plásmido pGEX4.1 transformado en la cepa BL21, para purificar a la proteína GST y utilizarlo como control negativo que pueda indicar si la unión de la proteína MibR con el ADN es legítima. Para ello, se indujo la expresión de la proteína GST con 0.1mM de IPTG en medio LB durante 3 h a 37°. En la figura 11a se muestra el análisis en SDS-PAGE al 10% de la inducción de la proteína la cual tiene un peso aproximado de 25 KDa. Posteriormente, se purificó a la proteína GST usando 10mM de glutatión reducido (Figura 11b). Después de hacer la cuantificación de la proteína total se obtuvo una cantidad neta de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



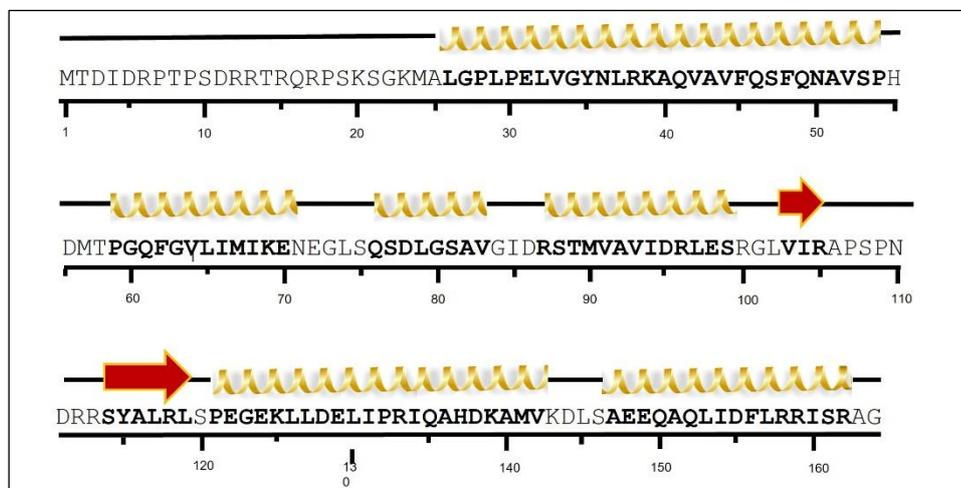
**Figura 11. SDS PAGE al 10% de la Inducción y purificación de la proteína GST.** A) Inducción con 0.1mM de IPTG Carril 1: MPM (Biorad), Carril 2: vacío, carril 3: ET (extracto total) inducido, carril 4: ET no inducido. B) Purificación de la proteína GST. Carril 1: MPM, Carril 2, 3 y 4: corresponden a las eluciones 1, 2 y 3, respectivamente.

## RESULTADOS BIOINFORMÁTICOS

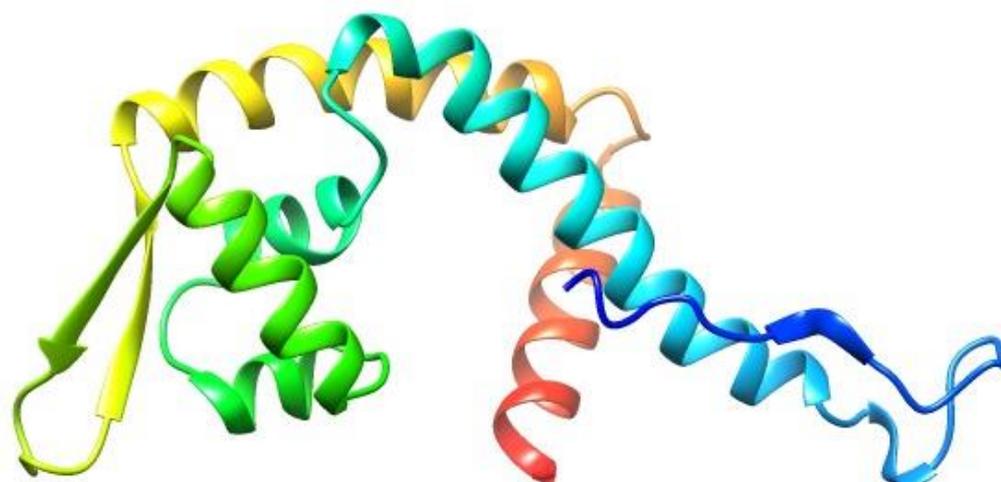
### Proteína MibR

La proteína MibR, está codificada por el gen WP\_051140036.1 localizado en el cromosoma de *A. brasilense* Sp7. Es una proteína de 164 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 18.2 KDa (Figura 13 A). A través de la plataforma I-TASSER se obtuvo el modelo tridimensional de la proteína MibR, la cual está constituida por 6 alfas-hélices y dos betas plegadas (Figura 13 B).

A)



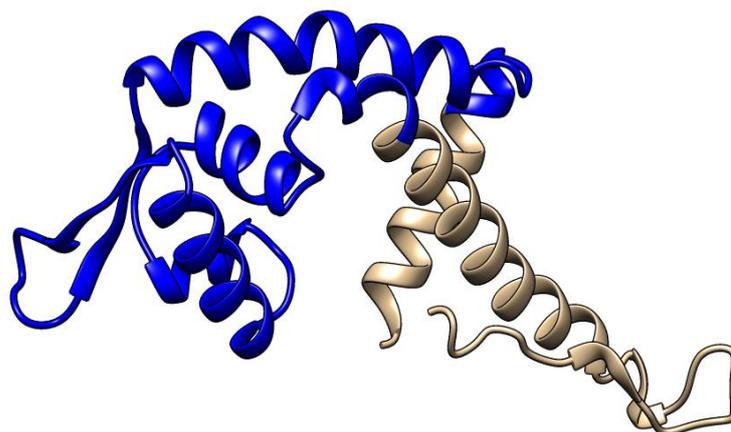
B)



**Figura 12. Estructura de la proteína MibR (WP\_051140036.1) de *A. brasilense* Sp7. A) Secuencia de aminoácidos de la proteína MibR con una longitud de 164 aminoácidos. B) MibR está constituida por seis alfa-hélices y dos beta plegadas identificadas por colores, C-score= -1.31 y RMSD=7.7 ±4.3Å y un TM-score fue de 0.55±0.15**

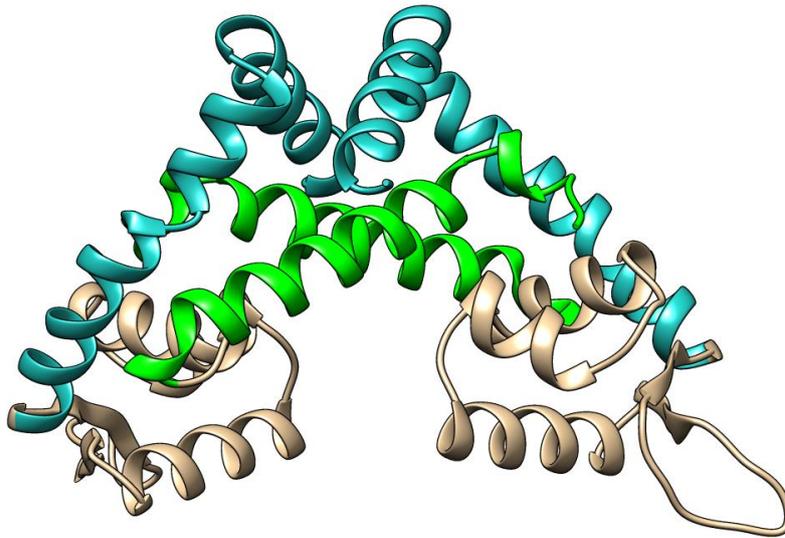
MibR se ha clasificado previamente como miembro de la familia MarR por la presencia del dominio hélix-turn-hélix (HTH) que sugiere la unión con el ADN, otorgándole una posible función como regulador transcripcional. Para identificar dicho dominio, se realizó un análisis con la plataforma SMART, la cual predice el dominio HTH de 100 aminoácidos de longitud, del aminoácido 50 al 150.

Posteriormente, el dominio HTH se ubicó en la estructura tridimensional de MibR utilizando la plataforma SMART para la predicción del dominio y el software Chimera para su visualización, observando que el dominio abarca la mayor parte de la proteína, solo dejando fuera casi en su totalidad a las hélices 1 y 6 (Figura 14).



**Figura 13. Dominio HTH de la proteína MibR de *A. brasilense* Sp7.** La sección coloreada en azul corresponde al dominio HTH característico de reguladores de la transcripción el cual se predice según la plataforma SMART de 100 aminoácidos de longitud abarcando la totalidad de las alfa hélices 2, 3, 4 y 5, incluidas las dos betas plegadas.

Los miembros de la familia MarR realizan sus funciones a través de homodímeros, que les permiten unirse a secuencias palindrómicas, semipalindrómicas o repeticiones invertidas, por lo que para evaluar si esta característica se comparte también con la proteína MibR, se llevó a cabo un modelado tridimensional de la misma mediante el uso de la plataforma SWISS MODEL. El modelo del homodímero de MibR se realizó utilizando como plantilla el cristal de la proteína CouR (ID: 6c9t) de *Rhodopseudomonas palustris* con una resolución de 2.07Å obtenida por cristalografía de rayos X. En la imagen 15, se pueden observar los sitios de dimerización entre los 2 monómeros de MibR encontradas en las hélices 1, 5 y 6.



**Figura 14. Modelo tridimensional del homodímero de MibR.** El cristal empleado para el modelado fue el de CouR cuyo cristal tiene un valor de 2.0Å, así como un valor de IDEN= 33.96% con respecto de MibR y GMQE=0.61. Los sitios de unión entre los monómeros de la proteína MibR se localizan en la alfa hélice 1, coloreadas en verde para cada monómero y las alfa-hélices 5 y 6 coloreadas en azul.

### Identificación de proteínas homólogas a MibR

Para identificar proteínas homólogas a MibR que permitieran conocer más sobre sus estructuras, ligandos y funciones y con ello incluso, identificar posibles proteínas cristalizadas en unión a AIA, a partir de los resultados con la plataforma I-TASSER, se identificaron las 10 proteínas presentes en la base de datos de proteínas (PDB) que tuvieran la similitud estructural más cercana a partir de los valores de TM-score (Tabla 1). Los resultados mostraron distintos datos de interés, entre ellos, que no se encuentran aún en PDB, proteínas cristalizadas miembros de la familia MarR del género *Azospirillum* ni tampoco miembros de esta familia en unión a AIA. Dentro de estas diez proteínas identificadas en PDB destaca la presencia de los reguladores PcaV, HucR, CouR y SlyA ya que constituyen los reguladores transcripcionales mejor caracterizados dentro de la familia MarR. Por otro lado, en la búsqueda de las proteínas con mayor similitud estructural se tomó en cuenta que los valores de TM-score fueran lo más cercanos a 1 y para el caso del análisis con respecto a MibR, el mayor valor de TM-score es de 0.798 con respecto a la proteína RdhR de *Dehalococcoides mccartyi* y el menor valor el de la proteína AbsC de *Streptomyces coelicolor* con 0.739; sin embargo todos los valores indican una buena similitud en cuanto a plegamiento de MibR con sus respectivos moldes, al ser todos mayores a 0.5 y

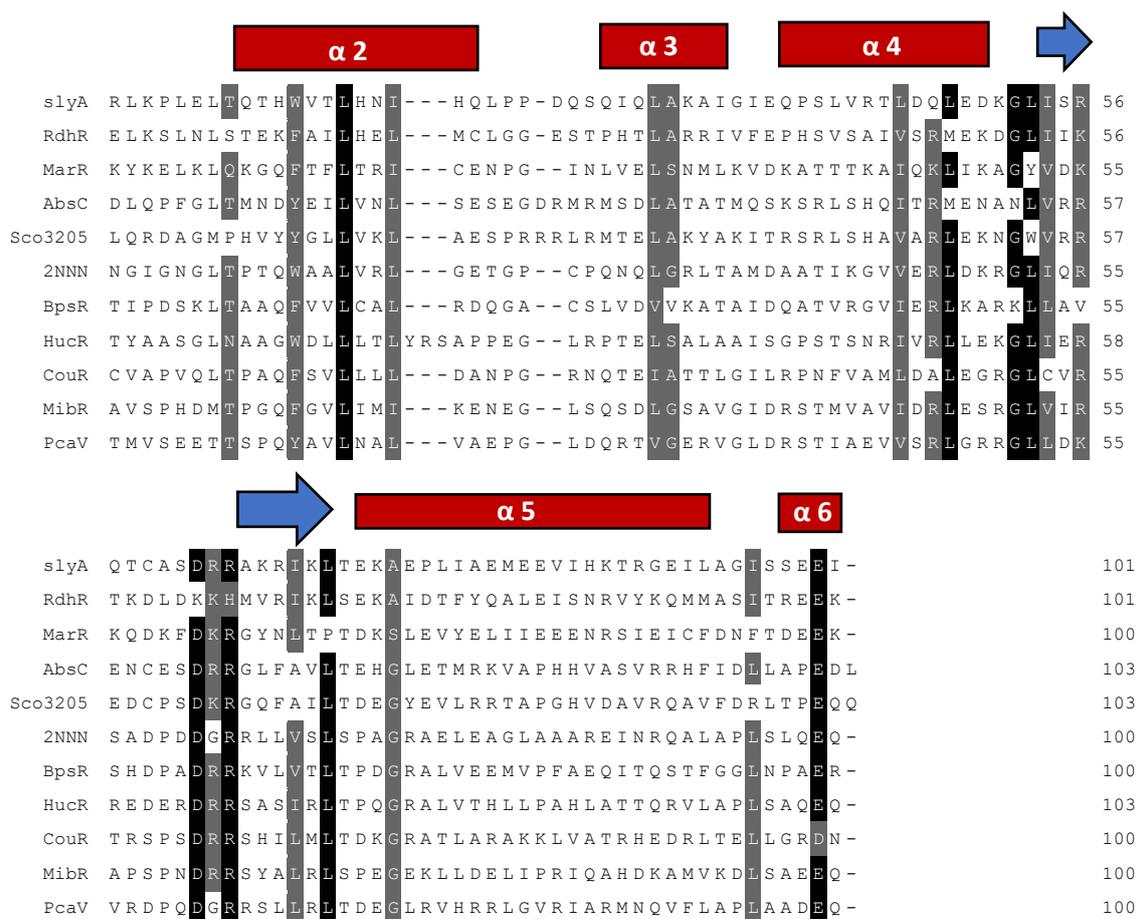
más cercanos a 1. Por su parte, los valores de RMSD indicaron una buena calidad en la estructura dado que el menor valor encontrado fue de 1.35 para la proteína 2NNN de *Pseudomonas aeruginosa* y el mayor valor fue de 2.58 para HucR de *Deinococcus radiodurans*, recordándose que los mejores valores son considerados como los más cercanos al cero y menores a 5. Con respecto al porcentaje de identidad entre las secuencias (IDENa), se observa que las de mayor valor corresponden a PcaV con 32%, CouR con 31%, BpsR con 30%, 2NNN con 29% y finalmente Sco3205 y SlyA con 23%, mientras que las restantes mantienen una identidad por debajo del 20% (tabla 1).

#	Nombre de la Proteína	organismo	TM-Score	RMSD	IDENa
1	RdhR	<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	0,798	1,83	13%
2	PcaV	<i>Streptomyces coelicolor</i>	0,785	1,69	32%
3	BpsR	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0,781	1,80	30%
4	Sco3205	<i>Streptomyces coelicolor</i>	0,769	1,85	23%
5	HucR	<i>Deinococcus radiodurans</i>	0,761	2,58	19%
6	2NNN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,758	1,35	29%
7	CouR	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	0,757	2,02	31%
8	SlyA	<i>Salmonella tiphimurium</i>	0,756	1,48	23%
9	MarR	<i>Peptoclostridium difficile</i>	0,750	2,23	19%
10	AbsC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	0,739	2,36	20%

**Tabla 1. Proteínas con mayor similitud estructural con la proteína MibR presentes en PDB.** Los resultados de I-TASSER arrojan a la proteína RdhR de *Dehalococcoides mccartyi*, como el mejor molde para la elaboración del modelo tridimensional de la proteína MibR. TM-score (con rango del 0 al 1) y RMSD (con rango del 0 al 5); valores los cuales indican buena calidad en el alineamiento estructural con MibR.

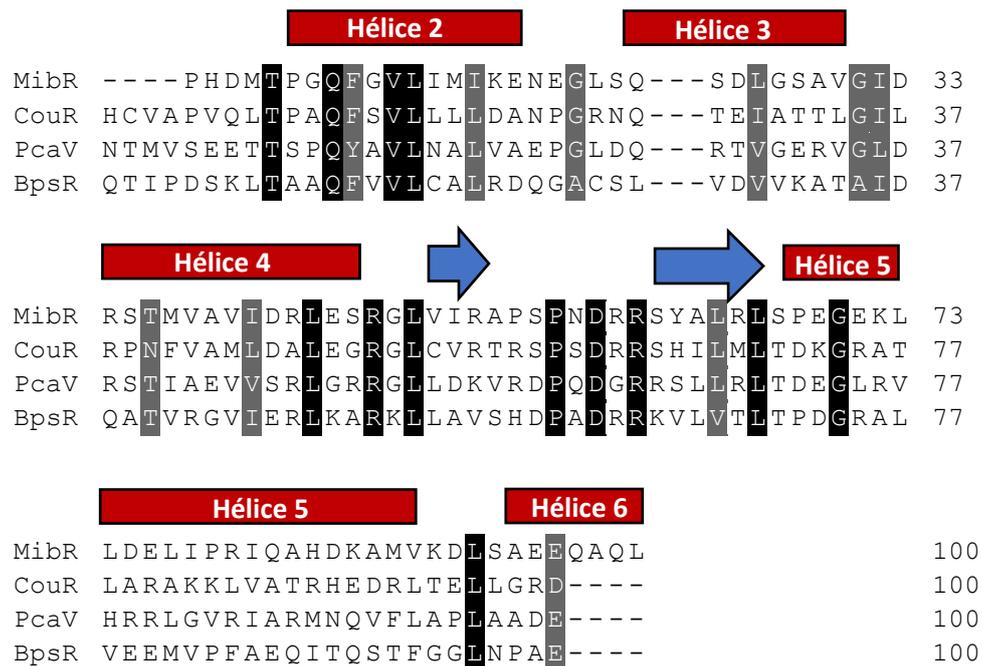
Una de las características más notables de la familia MarR, es que entre sus miembros existe una baja conservación a nivel de estructura primaria, lo que se comprobó en un alineamiento múltiple de secuencias de tipo global entre los miembros de la familia MarR obtenidos en la plataforma de I-TASSER y MibR, utilizando las plataformas Clustal Omega y Multiple Aling Show buscando un 100% de identidad, sin embargo, el alineamiento fue casi nulo (datos no mostrados). Posteriormente, se realizó un alineamiento local con el dominio HTH tomando en cuenta una identidad o similitud del 80%. En la figura 16, se observa

el nivel de conservación presente en residuos hidrofóbicos como fenilalanina (F), leucina (L), isoleucina (I), valina (V) y alanina (A) de las betas plegadas y en todas las alfa hélices exceptuando la número 1. Para la mayoría de los miembros de la familia MarR se propone un rol como represores de la transcripción, en los cuales en el dominio HTH se encuentra también el sitio de unión al ligando, el cual compite con el DNA para generar una separación entre ellos, permitiendo la expresión del gen. En este sentido, debido a que estas proteínas tienen distintos ligandos es de esperarse una baja conservación de los aminoácidos en dicha región.



**Figura 15. Alineamiento del dominio HTH entre MibR y las 10 proteínas más parecidas a ella según su estructura terciaria en la plataforma I-TASSER. Se realizó la búsqueda con 80% de identidad.**

Debido a la baja identidad a nivel de estructura primaria de las proteínas de la familia MarR, se seleccionaron aquellas con los mejores valores de identidad de acuerdo con la tabla 1, los cuales son mayores o iguales al 30%. De esta manera, se incluyeron las proteínas PcaV de *S. coelicolor* con 32%; CouR de *R. palustris* con 31% y BpsR de *B. bronchiseptica* con 30% y en el cual se observa una mayor conservación de aminoácidos en la estructura de las alfa hélices y las beta plegadas, los cuales en su mayoría también son hidrofóbicos (Figura 17).



**Figura 16.** Alineamiento del dominio HTH de MibR y 3 miembros de la familia MarR cristalizados.

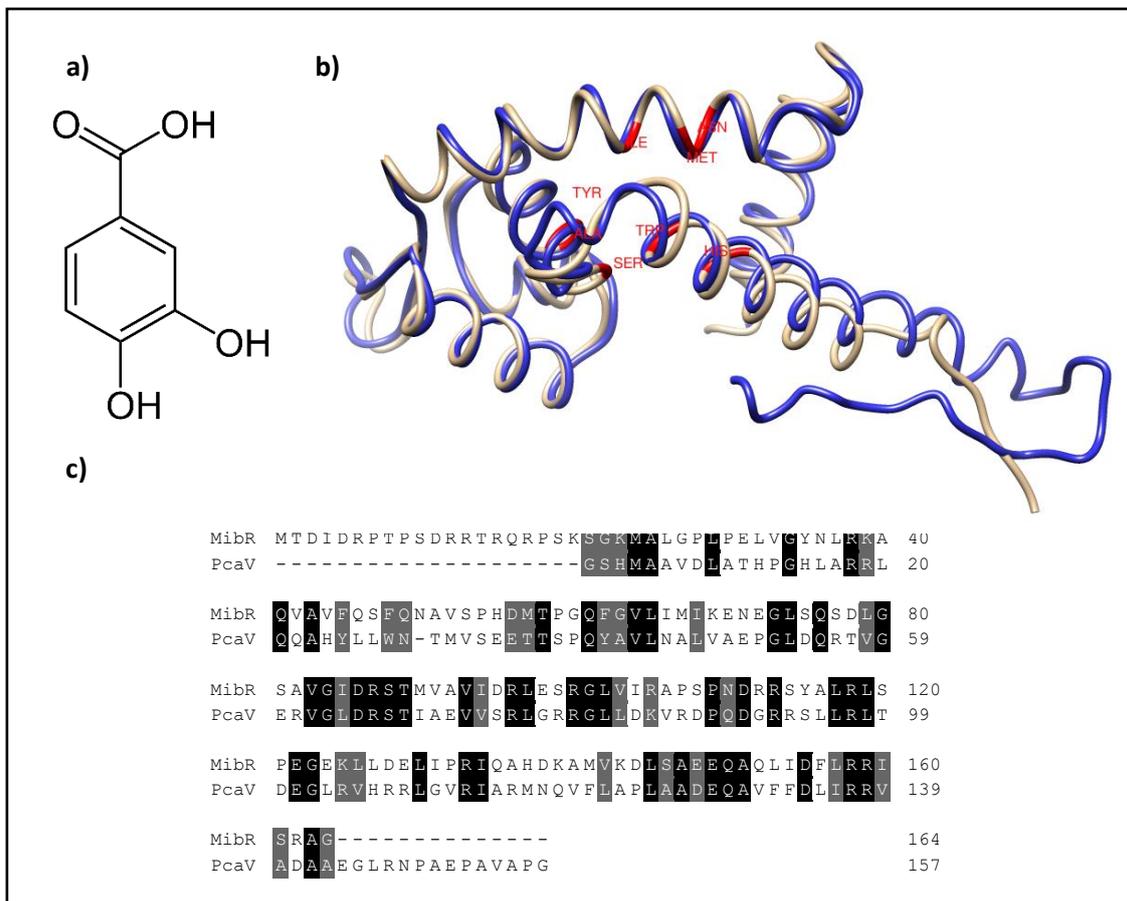
## Análisis estructural de las proteínas CouR, BpsR y PcaV vs MibR

Una de las características de los miembros de la familia MarR es su baja similitud y conservación en secuencias de aminoácidos, sin embargo, a nivel tridimensional éstas mantienen una mayor relación respecto a su estructura terciaria. En este estudio, se indagó acerca de la estructura de cada una de las tres proteínas con mayor similitud en cuanto a su estructura terciaria con MibR depositadas en la base de datos PDB (PcaV, CouR y BpsR).

De manera general, estas tres proteínas comparten con MibR las siguientes características: a) contienen en su estructura 6 alfa hélices y 2 beta plegadas a excepción de PcaV que tiene 3, b) forman homodímeros y c) participan en el catabolismo de compuestos aromáticos. Éste último dato, es de gran interés debido a que hemos propuesto que MibR, para llevar a cabo sus funciones, podría unirse a AIA molécula que en su estructura contiene un anillo bencénico característico de los compuestos aromáticos.

La proteína PcaV pertenece a la actinobacteria *S. coelicolor* tiene un peso molecular de 157 a.a (7 aminoácidos menos que MibR) y sus valores de TM-

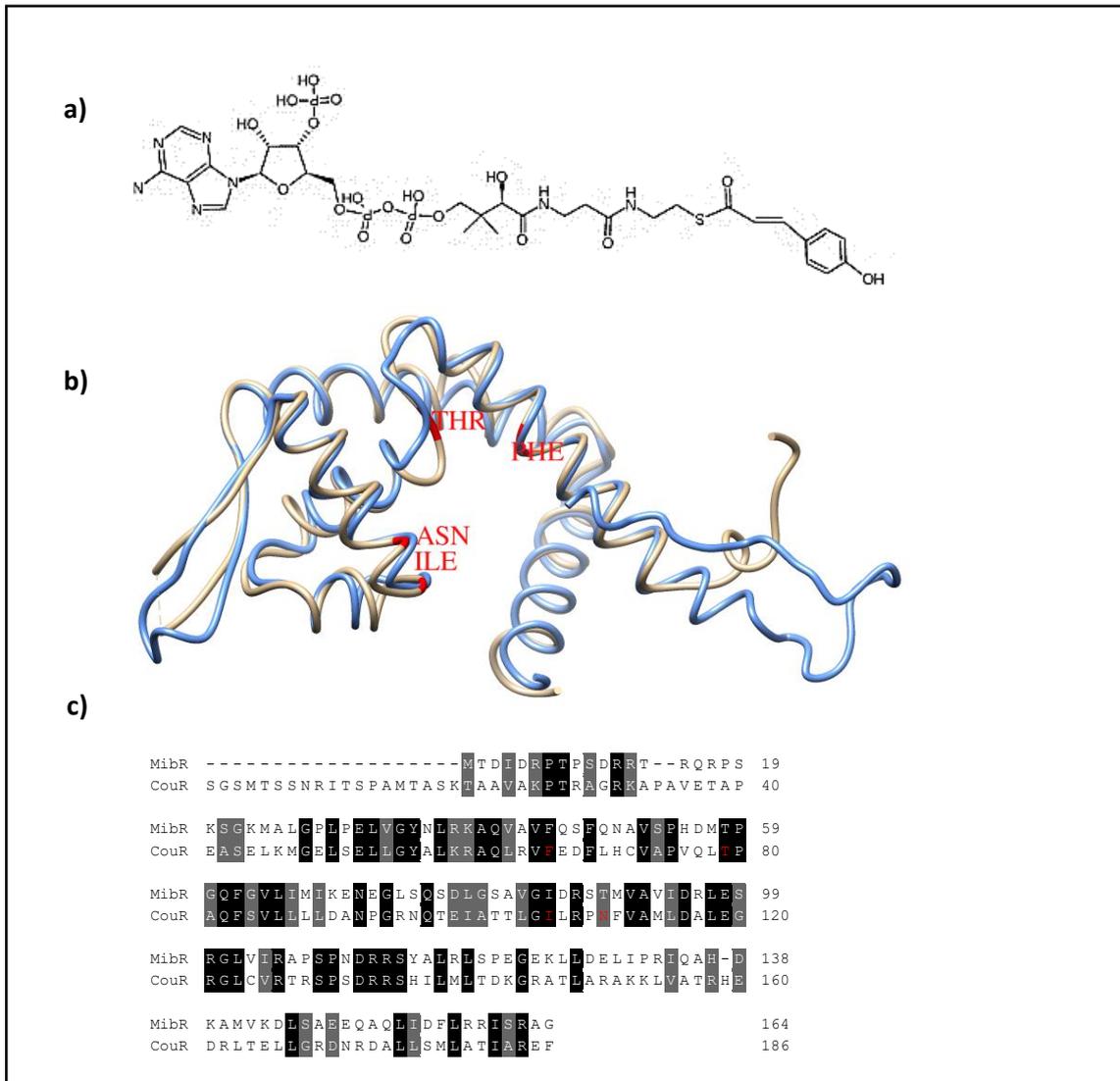
score y RMSD fueron de 0.785 y 1.69 respectivamente, los cuales indicaron un buen alineamiento con respecto de MibR. Se conoce que el ligando de PcaV es el protocatecuato (Davis 2013), molécula que contiene de un anillo aromático en su estructura similar al anillo indol del AIA (Figura 18a). Los aminoácidos que participan en la unión entre PcaV con su ligando se encuentran en las hélices 1, 2 y 5, siendo estos la H21, W25, S35, Y38, A39, I110, M113 y N114 tal como se observa en el alineamiento a nivel de estructura primaria y terciaria (Figura 18b y 18c). De estos aminoácidos solo se encontró similitud entre el W25 y la F de MibR en esta posición, la Y38 y A 39 que cambian por F y G respectivamente en MibR y finalmente la única identidad encontrada fue en la posición de la I 110.



**Figura 17. Alineamiento de la proteína MibR y PcaV.** a) Estructura química del protocatecuato. b) Alineamiento de las estructuras terciarias, en donde PcaV se muestra en café y MibR en azul, se señalan los aminoácidos que interactúan con el ligando en rojo. TM-score 0.785 y RMSD 1.69 c) Alineamiento de la estructura primaria generado con la plataforma Clustal Omega y *Multiple align show*.

La proteína CouR pertenece a la  $\alpha$ -proteobacteria *R. palustris*, posee 187 a.a (23 aminoácidos más que MibR) y sus valores de TM-score así como RMSD son de 0.757 y 2.02 respectivamente, lo cual indica un buen alineamiento con MibR. Su

ligando es el P-cumaroil Co-A (Figura 19a) un ligando de gran tamaño en comparación con las proteínas analizadas, por lo que el estudio de los aminoácidos de CouR que interactúan con dicho ligando es analizado con cuidado solo para conocer el papel que cumplen dentro de la interacción. Así, se logró determinar que los aminoácidos que participan son: Phe-63, Ile-103, Thr76 y Asn 107 los cuales se encuentran distribuidos a lo largo del alfa hélice número 1, 2 y 4, tal como se muestra en el alineamiento tanto a nivel de estructura terciaria, como primaria (Figura 19b y 19c). El alineamiento realizado entre ambas proteínas muestra que los aminoácidos de CouR que participan en la unión con su ligando, Phe63, Thr76, Ile103 y Asn107, si bien se conservan para MibR en el residuo 63, 76 y 103, cambia por una Thr de la misma familia de aminoácidos en el residuo 107; de tal manera que esta proteína mostró la mayor conservación en el número de aminoácidos que interactúan con su ligando.

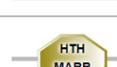


**Figura 18. Alineamiento de la proteína MibR y CouR.** a) Estructura química del P-cumaroyl Co-A. b) Alineamiento de las estructuras terciarias, en donde CouR se muestra en café y MibR en azul, en donde se señalan los aminoácidos que interactúan con el ligando en rojo. TM-score 0.757 y RMSD 2.02 c) Alineamiento de la estructura primaria generado con la plataforma Clustal Omega y *Multiple align show*.

Finalmente, la proteína BpsR de la  $\beta$ -proteobacteria *B. bronchiseptica*, tiene valores TM-score y RMSD de 0.781 y 1.80 respectivamente, los cuales indican la confianza del alineamiento realizado con MibR, posee 195 a.a (31 aminoácidos más que MibR) y realiza su función como regulador transcripcional relacionado al estrés dentro de la bacteria a través de su unión con el ligando ácido 6 hidroxipiridina 3 carboxílico (Figura 20a). En cuanto a su estructura, se sabe que los aminoácidos que llevan a cabo su interacción con el ligando son: Tyr15, His23, Arg26 y la His 32, los cuales se encuentran a lo largo del alfa hélice



proteínas homólogas a MibR, lo cual resultó en la coincidencia de 19 genes de acuerdo con el método de alineamiento que utiliza la plataforma. Posteriormente, las secuencias de aminoácidos de estos genes fueron analizados en la base de datos del NCBI para conocer su código a la par de analizarlas con la plataforma SMART para confirmar la presencia del dominio HTH característico de los miembros de la familia MarR lo que permitió tener al final un total de 15 proteínas además de MibR (Tabla 2), debido a que tres de ellas no contenían el dominio HTH y una de ellas no contenía la secuencia completa. En este grupo de proteínas y con respecto a MibR, hay cuatro con mayor tamaño (174, 175, 180 y 177aa), mientras que once son más pequeñas, teniendo la más pequeña 22 aminoácidos menos que MibR. En promedio, estas proteínas tienen una longitud de 160 aa y el dominio HTH de 101 aa. En el caso de las proteínas con el ID WP\_035670890.1 y WP\_035674181.1 se identificó una región de baja complejidad, lo cual indica que, además de poseer el dominio que permite la unión de las proteínas con el ADN, es posible que estas también posean una función adicional e incluso una estructura terciaria extra, ya que se conoce que estas regiones pueden formar alfa hélices e incluso beta plegadas que confieren una función específica en células procariontas por ejemplo, la de promover movimientos moleculares en sistemas TonB/TolA, entre otras muchas funciones (Brewer, 1990; Ntountoumi *et al.*, 2019).

Código NCBI	Longitud de la proteína en aa	Rango de aa del dominio HTH y su longitud	Esquema
WP_051140036.1 (MibR)	164	50-150 101 aa	
WP_035675085.1	146	35-135 101 aa	
WP_035673531.1	174	47-147 101 aa	
WP_051140205.1	142	18-118 101 aa	
WP_051140473.1	160	48-148 101 aa	
WP_035679514.1	152	30-130 101 aa	
WP_035679951.1	151	32-132 101 aa	
WP_035670890.1	175	42-142 101 aa	
WP_035678360.1	158	38-139 102 aa	
WP_051140780.1	158	33-134 102 aa	
WP_035676861.1	157	32-130 99 aa	
WP_035674181.1	180	56-155 100aa	
WP_035679196.1	177	51-156 106 aa	
WP_014240398.1	157	28-128 101 aa	
WP_035680630.1	160	29-130 102 aa	
WP_035670909.1	146	19-123 105 aa	

**Tabla 2.** Proteínas homólogas a MibR en el genoma de *A. brasilense Sp7*.

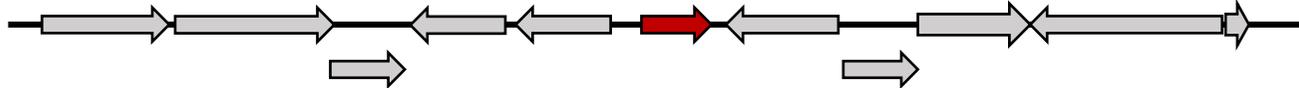
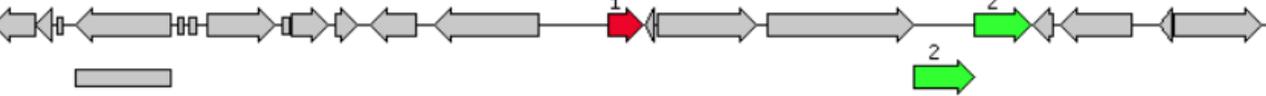
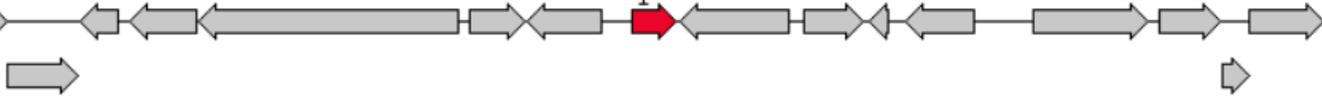
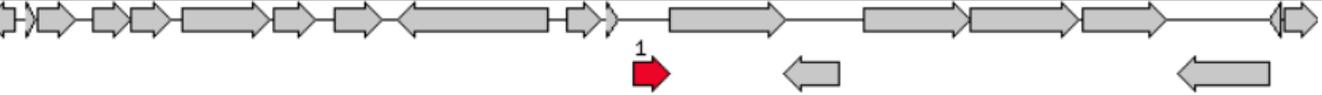
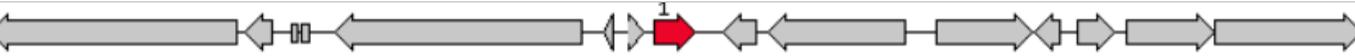
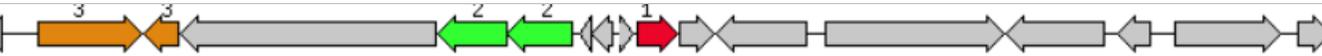
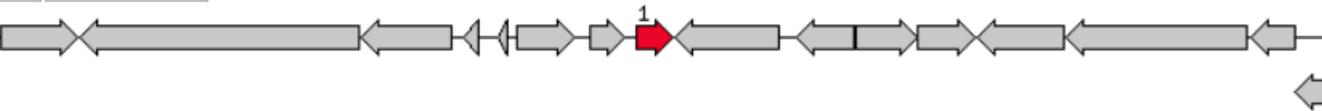
A partir de estos mismos resultados se evaluaron tres características que, de acuerdo con la literatura (Will y Fang, 2020) están presentes en algunas proteínas de la familia MarR: a) el gen que codifica para ellas se encuentre en un operón, b) el gen en cuestión se encuentre divergente de otro y c) que exista algún transportador en su contexto genético. Así, aunque estas características no se encuentran en todos los miembros MarR, este análisis nos permitió conocer cuáles de estas características están presentes en los genes que codifican a proteínas homólogas a MibR en el genoma de *A. brasilense* Sp7.

De los 15 genes analizados (tabla 3), se hallaron 12 genes presentes en posibles operones (WP\_051140205.1, WP\_051140473.1, WP\_035679514.1, WP\_035679951.1, WP\_035670890.1, WP\_035678360.1, WP\_051140780.1, WP\_035674181.1, WP\_035679196.1, WP\_014240398.1, WP\_035680630.1, WP\_035670909.1), considerando aquellos que tienen el mismo sentido de la transcripción, a pesar de que aún no se conoce la naturaleza de todos los genes encontrados en sus contextos genéticos, por lo que se tendría que realizar análisis más a profundidad y con otras plataformas que pudieran definir si se trata o no de un operón. En el caso del gen *mibR*, este no se encuentra formando parte de un operón. Con este mismo análisis se identificó que 6 genes (incluyendo a *mibR*) se transcriben de forma divergente (WP\_051140036.1, WP\_035675085.1, WP\_035673531.1, WP\_035676861.1, WP\_035674181.1, WP\_035680630.1).

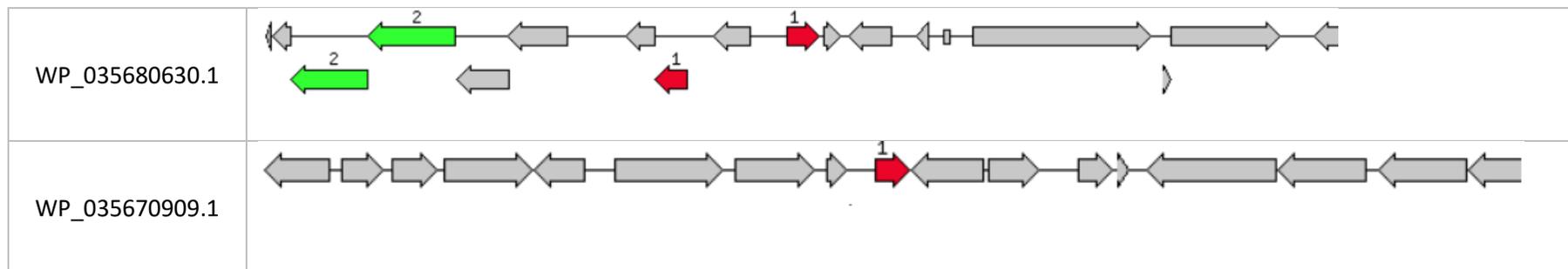
Finalmente, solo 8 (incluyendo a *mibR*) poseen transportadores celulares cercanos en su contexto genético (WP\_051140036.1, WP\_035675085.1, WP\_051140205.1, WP\_051140473.1, WP\_035679514.1, WP\_035670890.1, WP\_014240398.1, WP\_035670909.1). Dichos transportadores forman parte de diferentes familias entre las que se encontraron a los transportadores dependientes de ATP del tipo ABC (*ATP-binding cassette*), BCR (*Bacitracin ABC transporter*) y MFS (*The major facilitator superfamily*).

Un hallazgo interesante fue que en el contexto genético de los genes que codifican para las proteínas con ID's: WP\_051140780.1 y WP\_035680630.1 muestran la presencia de otras proteínas homólogas a MibR cercanas entre ellas.

Una vez analizados los contextos genéticos de los genes que codifican para proteínas homólogas a la proteína MibR, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias del dominio HTH en donde se logra corroborar la baja conservación de aminoácidos entre cada proteína incluso dentro de un mismo organismo que es *A. brasilense* Sp7 (figura 21).

Código NCBI	Contexto genético
WP_051140036.1 (MibR)	
WP_035675085.1	
WP_035673531.1	
WP_051140205.1	
WP_051140473.1	
WP_035679514.1	
WP_035679951.1	

WP_035670890.1	<p>Genomic map for WP_035670890.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right, and a green arrow labeled '2' points left. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_035678360.1	<p>Genomic map for WP_035678360.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right, and a green arrow labeled '2' points left. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_051140780.1	<p>Genomic map for WP_051140780.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right, and a green arrow labeled '2' points right. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_035676861.1	<p>Genomic map for WP_035676861.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_035674181.1	<p>Genomic map for WP_035674181.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right, and a green arrow labeled '2' points right. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_035679196.1	<p>Genomic map for WP_035679196.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>
WP_014240398.1	<p>Genomic map for WP_014240398.1 showing a sequence of genes. A red arrow labeled '1' points right. Other genes are represented by grey arrows pointing in various directions.</p>



**Tabla 3. Contexto genético de genes homólogos de la proteína MibR en el genoma de *A. brasilense* Sp 7.** En color rojo se muestran los genes homólogos a MibR, los genes en color verde y amarillo indican a las proteínas con las que se comparte una misma función, que podrían estar presentes en el mismo genoma o en otros.

El mayor grado de conservación se observa entre las hélices 4 y 5 incluyendo las betas plegadas.

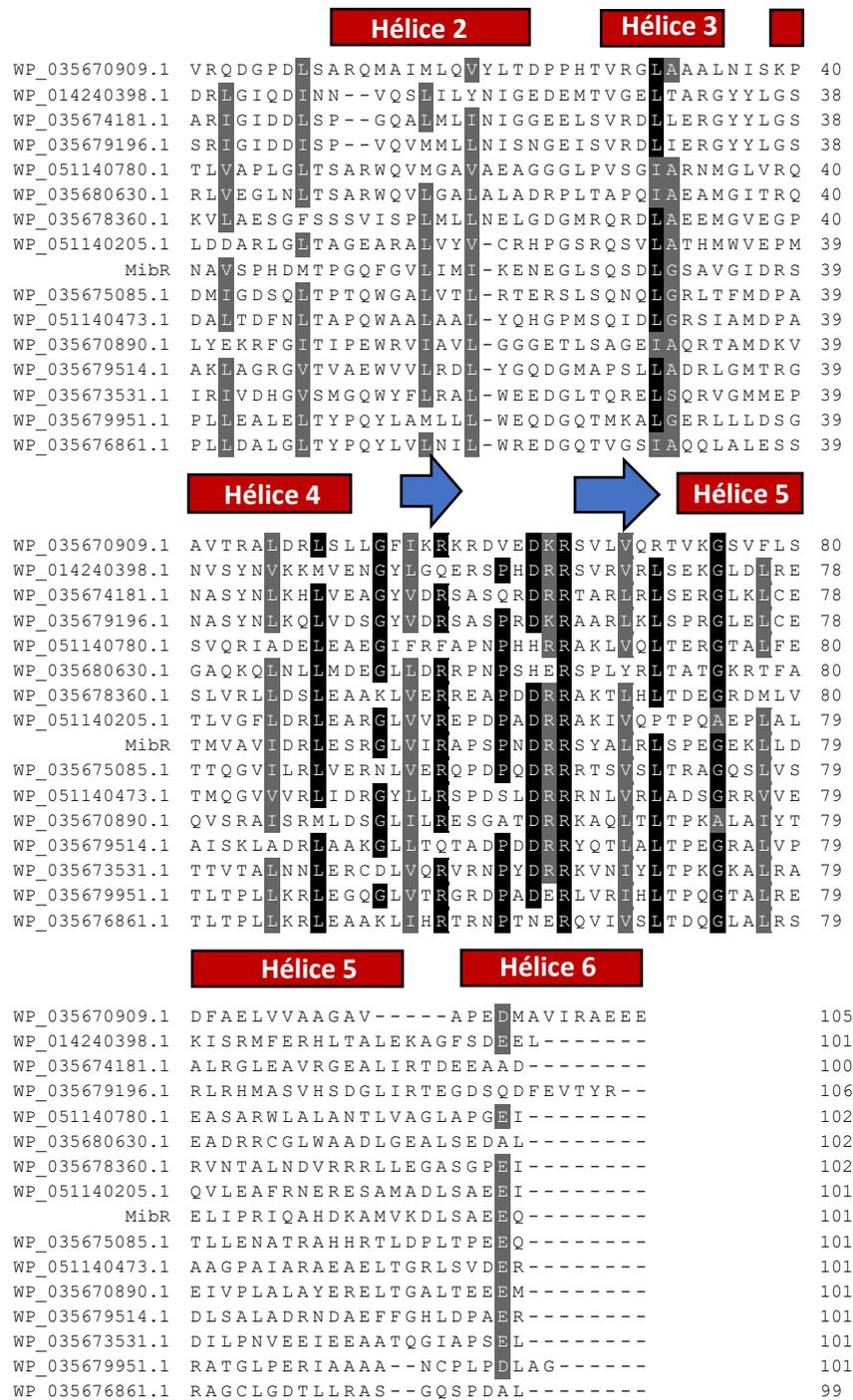


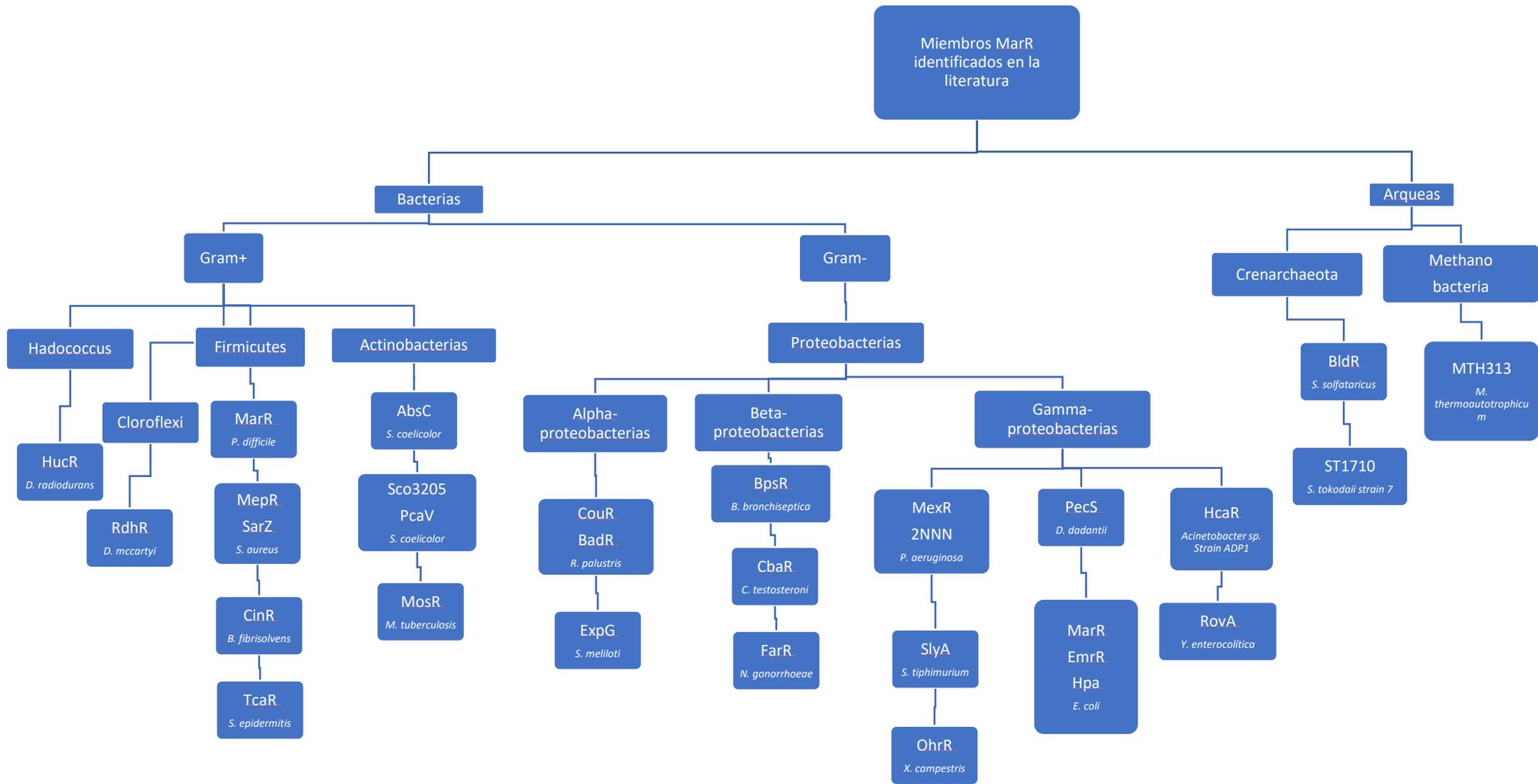
Figura 20. Alineamiento de la secuencia proteica de MibR y proteínas MarR encontradas en el genoma de *Azospirillum brasilense* Sp7.

El alineamiento de las proteínas MarR de *Azospirillum brasilense* Sp7 fue analizado tomando como punto de referencia tres miembros de la familia MarR ya cristalizados y disponibles en el PDB que presentaran el mayor porcentaje de identidad respecto a MibR (BpsR, PcaV y CouR), esto para conocer si alguno de los aminoácidos en los que difieren en los alineamientos sugeriría sobre el modo de acción de MibR o las proteínas MarR encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7. Así pues, la hélice 2 de los miembros MarR de esta bacteria poseen a los residuos L65 e I68 conservados mientras que el resto de aminoácidos que si aparecen en el otro alineamiento (Q61, F62 y V64) no se conservan, hecho que podría descartar a estos residuos como importantes para mantener la estructura de MibR, también se observa la ausencia de conservación de G73 encontrado entre la hélice 2 y 3, G80 de la hélice 3, G84 e I85 entre esta hélice y la 4 en la que tampoco se ubica la T89, también se ausentan los residuos R100 y L101 entre dicha hélice y la beta número 1, la cual resulta muy interesante puesto que parece ser una estructura de gran importancia en los miembros MarR de *A. brasilense* Sp7 ya que está conservada la mayor parte de la misma pero no lo es así para las proteínas MarR más parecidas en estructura terciaria a MibR. Entre la beta 1 y la numero 2 se encontraron los mismos residuos conservados con respecto al otro alineamiento a excepción del aminoácido R112, la beta 2 por su parte presenta los mismos aminoácidos conservados, mientras que ya no se conserva la L126 en la hélice 5, finalmente, la hélice 6 tiene el mismo residuo conservado. Conforme a lo anterior hay que destacar que el alineamiento de los miembros MarR en *A. brasilense* Sp7 coincidió en la característica de conservar gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos a lo largo de la estructura de cada proteína, sin embargo, también es notable la conservación de aminoácidos nuevos en estructuras interesantes como la beta número 1 con respecto de los primeros alineamientos y también hay que destacar la ausencia de otros aminoácidos que en cambio, si se conservaron en los miembros de la familia MarR de *A. brasilense* Sp7, lo cual nos abre camino para deducir que estos aminoácidos no conservados, no son requeridos para mantener la estructura terciaria de MibR.

## Identificación de miembros de la familia MarR en *A. brasilense ssp* y otros géneros bacterianos.

Después de llevar a cabo una búsqueda de proteínas cristalizadas de la familia MarR con AIA como ligando en el género *Azospirillum* y otros géneros bacterianos, nos dimos cuenta de que, a la fecha, no se cuenta con este tipo de información en el PDB, lo que limitó nuestra intención de realizar análisis de docking molecular entre MibR y AIA, por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica respecto a miembros de la familia MarR que permitiera identificar características respecto a sus ligandos, sus mecanismos de acción y estructura. La información disponible de estas proteínas es muy variable, ya que de algunas de ellas se conoce muy poco, sin embargo, la información encontrada se resume en la presente sección.

La revisión bibliográfica se realizó en las plataformas Pubmed y Scopus, de las cuáles se tomaron datos de 30 proteínas de la familia MarR de las que se cuenta con información a la fecha. De éstas, 27 corresponden a bacterias y 3 a arqueas. Estas proteínas corresponden a tres grupos principales: a) bacterias Gram+ en donde se encontraron 11 proteínas distribuidas entre los phyla *Hadobacteria*, Cloroflexi, Firmicutes y Actinobacterias; b) bacterias Gram- en donde se identificaron 16 proteínas pertenecientes a las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -proteobacterias; y, finalmente, solo 3 proteínas de Arqueas en donde 2 son del phylum *Crenarchaeota* y una es *Methanobacteria* (figura 22).



**Figura 21. Proteínas identificadas en la búsqueda bibliográfica.** Se incluyeron 27 proteínas de la familia MarR de bacterias y 3 Arqueas.

En la bibliografía, distintos autores clasifican a los miembros de la familia MarR en 3 distintos grupos, de acuerdo con el rol fisiológico que cumplen: 1) proteínas que participan en la respuesta al estrés ambiental, en donde se encuentran BpsR, HucR, OhrR, SarZ, RovA, MosR, PecS y SlyA 2) proteínas que regulan factores de virulencia, en donde se encuentran TcaR, FarR y ST1710; por último, 3) proteínas que regulan el catabolismo de compuestos aromáticos, en donde se encuentran AbsC, MepR, MexR, BldR, MarR, EmrR, CbaR, HpaR, ExpG, BadR, HcaR, MTH313, PcaV y CouR, siendo éstas últimas dos, las proteínas que mostraron mayor similitud tanto a nivel de estructura primaria como terciaria con MibR. Mientras tanto, se dejaron a las proteínas RdhR, Sco3205, 2NNN, MarR de *P. difficile* y CinR fuera de estos grupos al no encontrarse información acerca de sus funciones. En esta clasificación, considerando la participación de la proteína MibR en la regulación del gen *ipdC*, la hemos colocado dentro del grupo de las proteínas que regulan el catabolismo de compuestos aromáticos (tabla 4).

Respuesta al estrés del ambiente	Regulación de factores de virulencia	Regulación del catabolismo de compuestos aromáticos
<ul style="list-style-type: none"> <li>•BpsR</li> <li>•HucR</li> <li>•OhrR</li> <li>•SarZ</li> <li>•RovA</li> <li>•MosR</li> <li>•PecS</li> <li>•SlyA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•TcaR</li> <li>•FarR</li> <li>•ST1710</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•AbsC</li> <li>•MepR</li> <li>•MexR</li> <li>•BldR</li> <li>•MarR</li> <li>•EmrR</li> <li>•CbaR</li> <li>•HpaR</li> <li>•ExpG</li> <li>•BadR</li> <li>•HcaR</li> <li>•MTH313</li> <li>•PcaV</li> <li>•CouR</li> <li>•<b>MibR</b></li> </ul>

**Tabla 4.** Clasificación de las proteínas MarR de acuerdo con su rol fisiológico.

Por otro lado, respecto a su función como reguladores de la transcripción, se identificó que 20 poseen una función como reguladores negativos de la transcripción, mientras que BldR, BadR, AbsC, ExpG y RovA que se reportan como activadores de la transcripción, mientras que TcaR es el único que presenta una función dual (tabla 5).

Aunado al tipo de función que tienen, todas las proteínas encontradas cumplen su función al formar homodímeros, necesarios para la interacción con las secuencias palíndromes o semipalíndromes presentes en las regiones promotoras de los genes regulados, a excepción de HcaR de *Acinetobacter sp* strain ADP1, la cual regula el catabolismo de compuestos aromáticos en la forma de dímero, así como tetramero.

Proteína	función	Genes regulados
<b>BpsR</b> <i>B. bronchiseptica</i>	represor	<i>nicC</i> y <i>nicE</i>
<b>HucR</b> <i>D. radiodurans</i>	represor	<i>hucR</i> y <i>dr1160</i>
<b>SlyA</b> <i>S. tiphimurium</i>	represor	<i>Inv</i>
<b>PecS</b> <i>D. dadantii</i>	represor	<i>celZ</i> y <i>pelL</i> , <i>hrpN</i> , <i>hrcC</i> , <i>hrpN</i> y <i>hrcC</i>
<b>OhrR</b> <i>X. campestris</i>	represor	<i>ahpC</i> , <i>ahpF</i> , <i>katA</i> y <i>oxyR</i>
<b>SarZ</b> <i>S. aureus</i>	represor	<i>Hla</i>
<b>RovA</b> <i>Y. enterocolitica</i>	Activador	<i>Inv</i>
<b>MosR</b> <i>M. tuberculosis</i>	Dual	<i>rpoB</i> , <i>rpmE</i>
<b>TcaR</b> <i>S. epidermitis</i>	Dual	operón <i>icaADBC</i>
<b>ST1710</b> <i>S. tokodaii strain 7</i>	Represor	Gen ST1710
<b>FarR</b> <i>N. gonorrhoeae</i>	Represor	Operon <i>farAB</i> y gen <i>mtrCDE</i>
<b>PcaV</b> <i>S. coelicolor</i>	Represor	<i>Pca</i>
<b>CouR</b> <i>R. palustris</i>	Represor	Operón p-cumarato
<b>AbsC</b> <i>S. coelicolor</i>	Activador	Operón SCO7681-92
<b>MepR</b> <i>S. aureus</i>	Represor	<i>mepA</i>
<b>MexR</b> <i>P. aeruginosa</i>	Represor	<i>MexAB-oprM</i>
<b>BldR</b> <i>S. solfataricus</i>	Activador	<i>Sso2536</i>
<b>MarR</b> <i>E. coli</i>	Represor	Operón <i>marRAB</i>
<b>EmrR</b> <i>E. coli</i>	Represor	operon <i>emrRAB</i>
<b>CbaR</b> <i>C. testosteroni</i>	Represor	operon <i>cbaABC</i>
<b>HpaR</b> <i>E.coli</i>	Represor	operon <i>cbaABC</i> y operon <i>hpa-meta</i>
<b>ExpG</b> <i>S. meliloti2011</i>	Activador	operones <i>exp</i>
<b>BadR</b> <i>R. palustris</i>	Activador	operon <i>badDEFG</i>
<b>HcaR</b> <i>Acinetobacter sp. Strain ADP1</i>	Represor	operon <i>hcar</i>
<b>CinR</b> <i>B. fibrisolvens</i>	Represor	<i>cinB</i>
<b>Sco3205</b> <i>S. coelicolor</i>	Represor	<i>sco3204-sco3205</i>

**Tabla 5. Funciones asociadas a miembros de la familia MarR.** En su mayoría actúan como represores, en menor cantidad como activadores y una con actividad dual.

Finalmente, no se encontró información completa acerca de la estructura terciaria de 11 proteínas analizadas, sin embargo, de las 19 estructuras con las que si se cuenta información se observaron tres tipos de plegamiento: la primera en donde existen 6  $\alpha$ -hélices y 2  $\beta$ -plegadas como MibR de *A. brasilense*, MarR de *E.coli*, MepR, BpsR, ST1710 y CouR que a su vez es la proteína más parecida a nivel de estructura primaria y terciaria con MibR encontrada en el PDB; la segunda con 6 alfa hélices y 3 beta plegadas en donde se encuentran BldR, Sco3205, MosR, PcaV y MarR de *P. difficile*; y el tercer grupo con 7  $\alpha$ -hélices y 3  $\beta$ -plegadas en donde solo se encontró a SlyA.

Respecto a la identificación bibliográfica de proteínas de la familia MarR caracterizadas con su ligando (20 proteínas), los resultados se muestran en la tabla 6. En 11 casos han sido identificados también los aminoácidos que participan en su unión y el tipo de interacción que forman (Tabla 7). De las proteínas analizadas, para PecS, SarZ, RovA, MosR y MexR no ha sido identificado un ligando. En todos los casos se encontró que los ligandos de cada proteína contienen un anillo bencénico (compuesto aromático), a excepción de la proteína OhrR de *Xhantomonas* cuyo ligando es el tert-butil hidropéroxido (tBOOH) cumenehidropéroxido, la proteína PcaV con el ligando acetato (éster), la proteína HucR que se une al ácido úrico (compuesto heterocíclico), AbsC con el ligando etanediol (alcohol) y OhR que posee al ligando Terbutilhidropéroxido (peróxido) (Figura 23). En este sentido, la presencia del anillo bencénico es un dato interesante considerando que para MibR se ha propuesto al AIA como ligando. Respecto a la interacción de los ligandos y sus proteínas, la información disponible es muy variable, sin embargo, se ha identificado que esta unión se da en la región comprendida del dominio HTH y excepcionalmente fuera de él en la hélice número 1.

Proteína	Estructura del ligando	Ligando
<b>AbsC</b> <i>S. coelicolor</i>	Aromáticos y un alcohol	ácido 2 hidroxibenzóico, etanediol
<b>BldR</b> <i>S. Solfataricus</i>	aromáticos	benzaldehido
<b>FarR</b> <i>N. gonorrhoeae</i>	aromáticos	Ácido dihidroxibenzóico
<b>PcaV</b> <i>S. coelicolor</i>	Aromáticos y un ester	protocatechuato, acetato y ácido dihidroxibenzoico
<b>BpsR</b> <i>B.bronchiseptica</i>	aromáticos	ácido 6 hidroxinicotínico
<b>HucR</b> <i>D. radiodurans</i>	heterocíclico	Salicilato y ácido úrico
<b>CouR</b> <i>R. palustris</i>	aromáticos	p-cumaronil-coA
<b>SlyA</b> <i>S.tiphimurium</i>	aromáticos	ácido dihidroxibenzóico
<b>OhR</b> <i>X. campestris</i>	Aromáticos y un peróxido	tert-butil hidroperoxido, cumenehidroxidroperoxido
<b>SarZ</b> <i>S. aureus</i>	aminoácido	cisteína
<b>MarR</b> <i>E.coli</i>	aromáticos	salicilato, plumbagin, 2,4-hidrofenol, menadiona
<b>EmrR</b> <i>E.coli</i>	aromáticos	ácido nalidixico, salicilato, protonoforos, m-clorofenil hidrazona, 2,4- dinitrofenol,, bromuro de etidio
<b>CbaR</b> <i>C.testosteroni</i>	aromáticos	3-clorobenzoato, protocatehuato, acido 3-clorobenzóico
<b>CinR</b> <i>B. fibrisolvens</i>	aromáticos	ácido cinamico
<b>HpaR</b> <i>E. coli</i>	aromáticos	acido 4-hidroxifenil acetico, acido 3-hidroxifenil acetico y acido 3-4- hidroxifenil acetico
<b>BadR</b> <i>R. palustris</i>	aromáticos	benzoato, 4 hidroxibenzoato
<b>HcaR</b> <i>Acinetobacter sp. Strain ADP1</i>	aromáticos	ferulato, 3,4-dihydroxybenzoato, p-coumarato, y vanillina
<b>MTH313</b> <i>M.thermoautotrophicum</i>	aromáticos	salicilato*
<b>TcaR</b> <i>S. epidermitis</i>	aromáticos	salicilato
<b>ST1710</b> <i>S.tokodaii strain 7</i>	aromáticos	salicilato

Tabla 6. Proteínas de la familia MarR y sus ligandos.

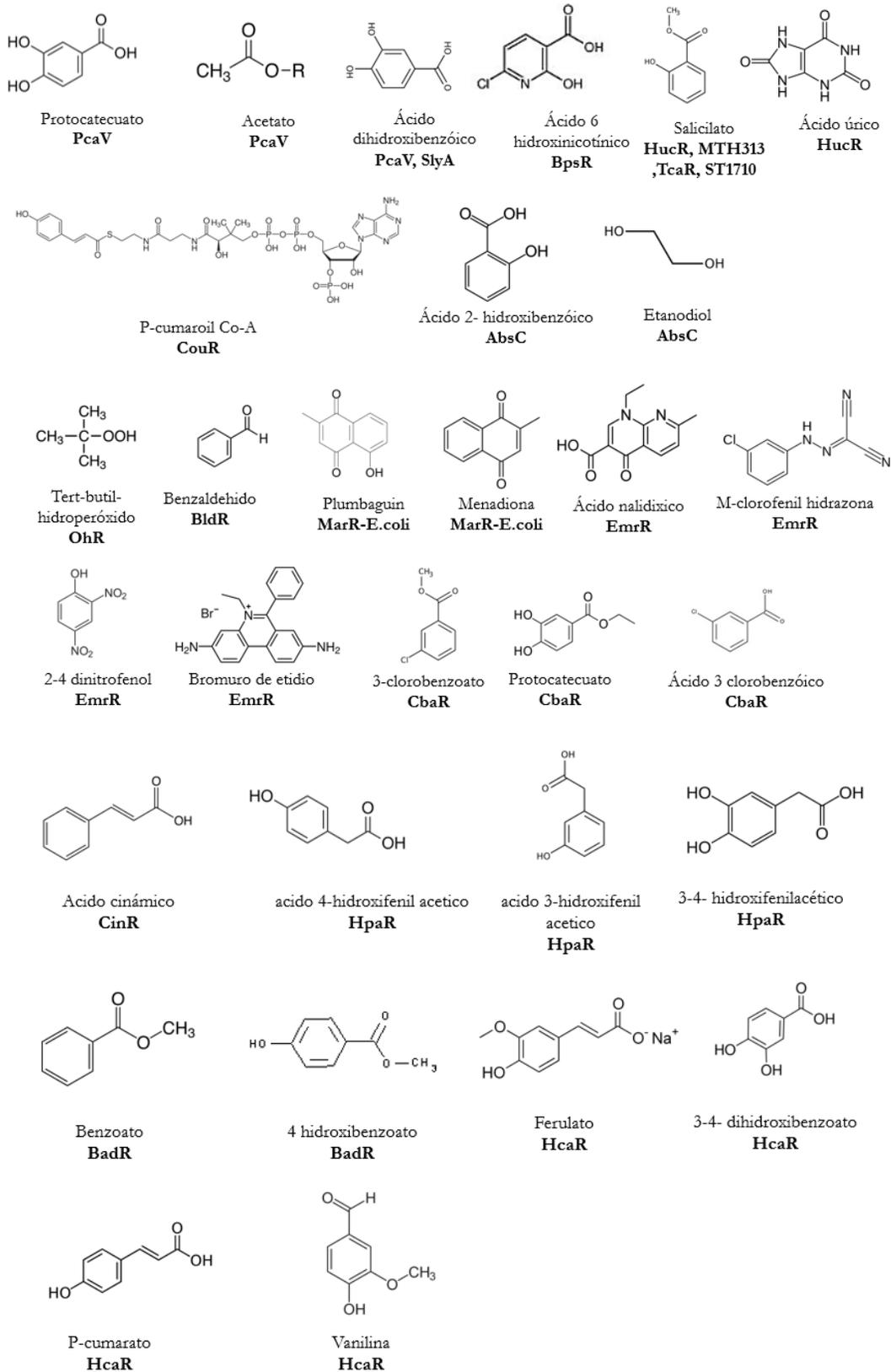


Figura 22. Ligandos de las proteínas de la familia MarR

Proteína	Ligando	Estructura del ligando	Interacción entre la proteína y su ligando
<b>BpsR</b> <i>B. bronchiseptica</i>	Ácido 6-hidroxicotínico	aromáticos	hélices 1, 2 y 5 de un monómero y la 1 del otro monómero. Y15, H23 y R26 y H32. Interacciones por puentes de H.
<b>HucR</b> <i>D. radiodurans</i>	Salicilato y ácido úrico	Aromáticos y compuesto heterocíclico	SAL-B. El ligando se une a W del $\alpha$ y A del $\alpha$ 2.
<b>SlyA</b> <i>S. tiphimurium</i>	Ácido dihidroxibenzoico	aromáticos	Forman un enlace de H y 2 de vander walls.
<b>ST1710</b> <i>S. tokodaii strain 7</i>	salicilato	aromáticos	El salicilato se une a Y37 y Y111, R20, K17 dentro de las beta 1 y 2 que forman el motivo wHTH.
<b>PcaV</b> <i>S. coelicolor</i>	protocatechuato, acetato y ácido dihidroxibenzoico	Aromáticos y un ester	El residuo H21 forma enlaces con el grupo OH del ligando, H9 forma un puente de H adicional. Posee especificidad de ligando basada en enlaces de hidrógeno con los grupos OH de compuestos fenólicos.
<b>CouR</b> <i>R. palustris</i>	p-cumaronil-coA	aromáticos	Residuos de las alfa hélices 5 (F-63, F-66, P-77 y F-80) y 1 (L-47 y Y-53).
<b>MepR</b> <i>S. aureus</i>	Toxinas catiónicas	aromáticos	L24, F27, I29, L37, L40, L100, F104, F109 se unen a ligando
<b>MarR</b> <i>E. coli</i>	salicilato, plumbagin, 2,4-hidroxifenol, menadiona	aromáticos	SAL-A hace contactos con T72 de la hélice de reconocimiento y R86 del ala. Forma puentes de H e interacciones de Van der Waals
<b>HcaR</b> <i>Acinetobacter sp. Strain ADP1</i>	ferulato, 3,4-dihydroxybenzoato, p-coumarato, y vanillina	aromáticos	En las Beta plegadas H 95, G96 y R97. Las hélices 1, 2 y 5 se unen a ligando Arg26. El pocket de unión tiene residuos hidrofóbicos que hacen puentes de hidrogeno con el ligando. En los pockets de unión se encuentran residuos como Tyr19, Ile28, Leu32, Phe46, Phe68 y Leu12, Ser18, Asp25, Arg26, Ser29 y Thr47.
<b>MTH313</b> <i>M. thermoautotrophicum</i>	Salicilato	aromáticos	SAL 1 entre la interface del dímero y el dominio de unión a ADN. El salicilato forma interacciones ionicas con K8 y R16 de la hélice 1.
<b>OhrR</b> <i>X. campestris</i>	Tert-butil hidroperóxido, cumenohidroxi droperoxido	Aromáticos y un peroxido	hélice 4 y 3 forman puentes de H con en ADN. Y36 y 47 son importantes en el cambio de estructura para liberar al ADN.

Tabla 7. Proteínas de la familia MarR, sus ligandos y su sitio de unión.

## DISCUSIÓN

El interés por conocer más acerca de la regulación genética concerniente a la biosíntesis del AIA, ha sido un tema de interés desde hace algunos años dada la importancia de esta molécula para la fisiología de plantas y bacterias (Mohite, 2013; Chandra *et al.*, 2018; Alemneh *et al.*, 2021). Dentro del grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, en el género *Azospirillum* existen pocos estudios respecto a la expresión y regulación transcripcional del gen *ipdC* que codifica para una indol piruvato descarboxilasa, enzima importante para la síntesis de hasta el 90% de la producción total de AIA en la bacteria (Carreño *et al.*, 2000; Malhotra y Srivastava, 2008). En este sentido, diferentes estudios han demostrado que en la región promotora del gen *ipdC* se encuentran diferentes elementos en cis que podrían participar en la regulación de su transcripción. Entre estos sitios se encuentra un elemento de respuesta a auxinas, dos repeticiones invertidas, un probable sitio de unión a ribosoma y una secuencia consenso de unión a  $\sigma^{54}$  (Vande Broek *et al.*, 2005; Rothballer *et al.*, 2005; Malhotra & Srivastava 2008). Específicamente, en este trabajo se indagó en el mecanismo mediante el cual una proteína con posible función de regulador transcripcional y miembro de la familia MarR, denominada MibR por su participación en la biosíntesis del AIA (Jijón, 2017), y contribuir a la regulación del gen *ipdC* en *A. brasilense* Sp7.

El gen *mibR* se encuentra localizado en el cromosoma de *A. brasilense* Sp7, lo que coincide con lo descrito por Jijón-Moreno en 2017. Así mismo, la predicción de la estructura terciaria de MibR reveló que está constituida por 6 alfa hélices y 2 beta plegadas, estructura determinada por el mismo autor a través de la plataforma PHYRE<sup>2</sup>, mientras que en el presente trabajo fue predicha a través de la plataforma I-TASSER, lo que permite comprobar dicha estructura a partir de dos plataformas distintas. Se ha determinado que en algunos miembros de la familia MarR, se pueden presentar diferentes plegamientos que incluso pueden tener un alfa hélice extra, así como una tercera beta plegada la cual consta de un solo aminoácido (Alekshun *et al.*, 2001). En este sentido, se debe ser muy minucioso en cuanto a la utilización del modelo generado en las plataformas digitales partiendo de la

precisión que éstas tengan para la predicción de estructuras que se formen de un solo aminoácido (Yang y Zhang, 2015). En el caso de I-TASSER los valores de confianza reportados permiten tener mayor certeza en cuanto a la estructura global de la proteína gracias al método de obtención de sus modelos, el cual tiene su fundamento en el uso de múltiples moldes que permiten identificar aquellos más parecidos a la proteína de interés, no solo en homología si no en estructura terciaria, lo que resulta ventajoso en este caso, debido a que la proteína MibR, como otros miembros de la familia MarR, mantienen una baja homología incluso a nivel de especie (Wilkinson y Grove, 2006).

El modelo obtenido mediante I-TASSER se generó a partir de un análisis exhaustivo utilizando las mejores coincidencias entre las proteínas más parecidas a nivel de estructura terciaria con MibR, de tal manera que no se realiza un modelado por homología si no más basado en la búsqueda de proteínas con el mismo plegamiento. Así pues, se obtuvo el modelo con el mejor C-score = -1.31 el cual toma en cuenta su rango de -5 a 2, de forma que se obtuvo un valor confiable para el modelado de la proteína MibR, aunque, por otro lado, se obtuvo un valor RMSD estimado de  $7.7 \pm 4.3 \text{ \AA}$  (figura 12), lo cual apenas entra dentro del rango tomado en cuenta como confiable para la estructura, el cual va del 0 al 5; sin embargo, esto puede explicarse por el método de obtención de cada valor dado que, si bien ambos miden la calidad estructural basados en alineamientos con la estructura de los péptidos utilizados como plantados, el RMSD es altamente sensible a los errores locales del alineamiento, mientras que el c-score toma en cuenta la convergencia de más parámetros para el ensamblaje de la estructura, como lo es el TM-score, el cual se considera bueno cuando es mayor a 0.5, y menor a 0.17. En el presente modelo de MibR el TM-score fue de  $0.55 \pm 0.15$ , lo que indica una topología correcta al tomar en cuenta los alineamientos de las distancias cortas entre proteínas en vez de darle más peso a las distancias grandes como lo hace el RMSD.

Con respecto a la predicción de los dominios presentes en la proteína MibR se determinó la presencia del dominio HTH, lo cual coincide con lo ya reportado para

los miembros de la familia MibR, puesto que se ha determinado que cada monomero posee un dominio HTH con un motivo wHTH (winged-helix-turn-helix) caracterizado por la presencia de alfa hélices unidas a beta plegadas antiparalelas que son conocidas como ala (Wintjens y Rooman, 1996; Religa *et al.*, 2007; Perera y Grove, 2010), tal como se observa en el dominio HTH la proteína MibR.

La baja conservación a nivel de estructura primaria obtenida como resultado de los análisis en I-TASSER, se explica por los múltiples reportes que indican la conservación de aminoácidos menor al 30%, que es característica de esta familia de proteínas, lo que también explica la enorme versatilidad que tienen estos reguladores para unirse a diversos ligandos, así como la variedad de estímulos a los que responden (Chang *et al.*, 2013; Will y Fang, 2020). Mientras que los aminoácidos que si se conservan se han relacionado con el mantenimiento del plegamiento general de las proteínas MarR, basado en la constitución de alfa hélices y beta plegadas importantes para su unión con el ADN como lo es la región del ala (beta plegadas) que promueve la unión con el surco menor, el alfa hélice número 4 para el reconocimiento del surco mayor y la hélice 2 que permite una mejor interacción con el esqueleto de fosfatos (Hong *et al.*, 2005; Rohs *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2017; Alekshun *et al.*, 2001); además, se ha determinado que el mantenimiento en los loops o giros de estas proteínas les confiere la flexibilidad que requieren para poder cambiar su conformación de manera que se modifique la forma del dominio de dimerización conformado por las hélices 1, 5 y 6, además de la 7 en los casos que esta exista (Alekshun *et al.*, 2001).

El modelo de MibR generado en I-TASSER fue util para analizar a esta proteína en su forma de monomero, además de identificar proteínas homólogas. Sin embargo, el modelo generado con SWISS-MODEL permitio obtener un modelo de MibR mas cercano a la manera en que actuan naturalmente los miembros de la familia MarR, es decir en forma de homodímero, inicialmente con la finalidad de realizar docking molecular dado que los programas para realizar dicho procedimiento requieren del uso de modelos mas cercanos a la forma adoptada por la proteina en la naturaleza y no solo como monómero (Krissinel, 2010). En este sentido, el modelo en forma de

homodimero obtenido en la plataforma SWISS-MODEL, como se indica en los resultados (Figura 14), fue generado a partir de la proteína CouR de *Rhodopseudomonas palustris*, esto debido a que fue el modelo que presentó mayor homología, sin embargo, esto no nos lo permitió, entre otras cosas, tener una estructura modelada adecuada para realizar docking molecular ya que el molde en cuestión se encuentra cristalizado en unión con P-cumaroil Co-A, que a pesar de ser un con anillo aromático, posee un tamaño que excede por mucho al ácido indol-acético, así como es también un tioester que contiene en su estructura más grupos hidroxilo además de los ubicados en el anillo aromático, esto es importante puesto que se sabe que la especificidad de muchos ligandos de las proteínas MarR está dada en parte por los puentes de hidrogeno que forman con sus grupos hidroxilo, este hecho está comprobado para CouR pues se conocen varios sitios de unión con puentes de hidrogeno, además de utilizar los grupos hidroxilo del  $\beta$ - fosfato del ligando. Por otro lado, la alfa hélice 1, que no pertenece al dominio HTH en CouR es capaz de formar interacciones hidrofóbicas con el ligando (Cogan *et al.*, 2018).

En el alineamiento realizado para los 3 miembros más parecidos a MibR (PcaV, CouR y BpsR) con un 30% o más de conservación, se observaron diferencias en la hélice 2 de dichas proteínas, al poseer un aminoácido similar extra, la hélice 3 tiene un aminoácido conservado menos y en la beta 1 no tiene residuos conservados. Conforme a esto se conoce que la hélice 2 hace múltiples enlaces con el esqueleto de fosfatos del ADN hecho por el que podría observarse una mayor conservación en los aminoácidos que conforman a las proteínas en cuestión (Will y Fang, 2020; Gajiwala *et al.*, 2000; Zheleznova y Brennan, 2001; van Aalten *et al.*, 2001; Wojciak *et al.*, 2001).

La comparación específica entre MibR y las estructuras terciarias de las proteínas PcaV, CouR y BpsR, resultó ilustrativa para conocer la posible forma de interacción de MibR con respecto a su ligando hipotético; el AIA. Así pues, al comparar PcaV con MibR se encontraron diferentes aminoácidos que, aunque no se conservan como tal, si corresponden a la misma familia de aminoácidos entre una y otra proteína, sin embargo, en la literatura correspondiente se menciona que, para que la unión de su ligando protocatecuato se lleve a cabo de manera específica es

totalmente fundamental la interacción del residuo H21 que forma puentes de hidrogeno con un grupo hidroxilo del ligando, grupo que a su vez resulta de vital importancia por su posición como sustituyente meta en la molécula de protocatecuato dado que se ha determinado que al cambiar esta posición en moléculas derivadas de este ligando, la unión se vuelve muy débil, dicho residuo se encuentra ubicado en el alfa hélice número 1 que no es parte del dominio HTH en PcaV, en tanto para MibR la His21 es sustituido por Valina que es un aminoácido hidrofóbico y, debido a lo anteriormente mencionado se puede descartar la interacción de MibR con una molécula como el protocatecuato ya que si bien se observan aminoácidos de la misma familia en las posiciones W25, Y38, A39 y la I110, no existe identidad entre los otros 4 aminoácidos que forman la cavidad de interacción con el ligando en el caso de PcaV, por otro lado, algo interesante a considerar es que, la hélice 1 es encargada de realizar las interacciones específicas en esta proteína en la que se ha determinado además la función del residuo H9, no conservado en MibR, el cual interactúa con el segundo grupo hidroxilo del protocatecuato lo cual también da especificidad a la interacción (Davis *et al.*, 2013). En este sentido es importante entonces considerar la evaluación de la posible interacción de aminoácidos que no se encuentren en el dominio HTH de MibR. Finalmente, PcaV también es interesante al ser participante en el metabolismo de compuestos aromáticos, así como lo es MibR, además *S. coelicolor* es una bacteria de suelo como *A. brasilense* Sp7, por lo que puede ser un buen punto de comparación para comenzar a dilucidar la función de la proteína de interés en este estudio.

CouR de *R. palustris* es una  $\alpha$ -proteobacteria de suelo que, al igual que *A. brasilense* Sp7, es capaz de degradar compuestos aromáticos que puede obtener de las plantas, lo que es interesante dado que es la proteína con mayor identidad a nivel de estructura primaria y por lo tanto la proteína elegida como molde en la plataforma SWISS-MODEL para realizar su modelado por homología. Sin embargo, aunque esta proteína parece ser un buen molde a elegir es difícil determinar si la unión a su ligando el P-cumaroil Co-A, podría darnos luz para conocer la función de MibR puesto que este ligando supera por mucho el tamaño del AIA por ello, el tipo

y numero de uniones con la proteína podrían diferir de manera importante aunque, un aspecto interesante de CouR es que a pesar del hecho anterior, su conformación general no cambia entre el cristal que posee al ligando unido con respecto de aquel que se observa unido al ADN (Cogan *et al.*, 2018). De esta manera, se han determinado interacciones con el ligando de CouR utilizando elementos de las hélices 1, 2 y 4, de las cuales hay que destacar que solo la hélice 4 pertenece al dominio HTH junto con ambas betas plegadas de la estructura de CouR y la hélice 3, conforme a este hallazgo es importante nuevamente considerar que las uniones con el ligando de MibR podrían darse fuera del dominio HTH, así como se observó anteriormente en el caso de PcaV. En cuanto a las interacciones en específico, se sabe que T76 de CouR, que también se conserva en MibR, genera contactos hidrofóbicos con el beta fosfato del ligando, sin embargo el AIA no contiene un grupo fosfato, por lo que puede descartarse alguna unión de este tipo, por otro lado, el otro aminoácido que se conserva en MibR es la F63 la cual es esencial para la unión del ligando, pues se ha demostrado que una mutación en el mismo afecta en gran medida la unión dentro de la cavidad de interacciones hidrofóbicas formadas por CouR, por ello, sería interesante estudiar también la cavidad que interaccionaría con el ligando sugerido para la proteína MibR en un análisis futuro de acoplamiento molecular para saber si dicho aminoácido también pudiera ser importante para esta proteína; con respecto a los residuo I103 y N107, se sabe que aportan interacciones poco específicas en el caso de CouR por lo que también pudiesen tener la misma función en MibR, aunque en el caso de N107 podría no existir función puesto que el mismo hace uniones con el esqueleto amida del P-cumaroil CoA, estructura química que no se encuentra en el AIA (Cogan *et al.*, 2018).

Al comparar a la proteína BpsR con MibR, encontramos que la bacteria *B. bronchiseptica* de la que proviene BpsR no comparte la forma de vida rizobia de *A. brasilense*, sino que es una bacteria que infecta el tracto respiratorio de humano, ambas bacterias pertenecientes a clases taxonómicas distintas, por lo que es poco probable encontrar conservado algún aminoácido entre ellos ya que se sabe que existe conservación de aminoácidos que interactúan con el ligando 6 hidroxipiridina 3 carboxilico pero solo en miembros específicos de la clase beta-proteobacteria

(Booth *et al.*, 2019; Camino, 2004). Lo anterior se refleja en que no se observan aminoácidos conservados a excepción de R26 que se sabe que genera un cambio importante en la estructura general de BpsR, sin embargo, habrá que considerar con cuidado este aminoácido en análisis posteriores para saber si este pudiese ser importante para MibR también. Tomando en consideración la comparación entre MibR y las proteínas de la familia MarR disponibles en el PDB, es importante recalcar la necesidad de contar con un cristal de alguna proteína de esta familia, que sea cristalizada en unión al ácido indol acético, lo cual permitiría definir con mayor precisión y confianza a los aminoácidos que podrían participar en dicha interacción a través de análisis de docking molecular, además de aportar evidencias que sume a la propuesta de que AIA es el ligando de MibR.

En el trabajo doctoral realizado por Jijón Moreno en 2017, se demostró que en una mutante por delección del gen *mibR*, existía una ligera disminución en la biosíntesis de AIA, así como en la expresión del gen *ipdC*, lo que generó la pregunta respecto a si en el genoma de *A. brasilense* Sp7 existen más genes que codifiquen para proteínas de este tipo, las cuales pudieran mitigar el efecto de la ausencia de MibR. En este trabajo se encontraron 15 proteínas del tipo MarR codificadas en el genoma de *A. brasilense* Sp7 a través de la plataforma RAST, la cual identificó 7 proteínas más de las que había descrito Jijón utilizando el servidor BLAST. Estos resultados podrían deberse a la constante actualización de las bases de datos. Algo que llama la atención es el hecho de que no se encontraron 4 de las 8 proteínas descritas por Jijón como posibles miembros MarR (WP\_035670890.1, WP\_079284972.1, WP\_035679514.1, WP\_051140919.1), por lo cual se sugiere profundizar en esta búsqueda a través de otras plataformas como el conserved domains de NCBI, para corroborar los datos obtenidos por RAST.

Por otro lado, de las proteínas halladas, solo 5 se encuentran dentro de posibles operones mientras que el resto, como MibR no lo están, mostrándose con ello la gran variabilidad en cuanto a la posición dentro de un contexto genético incluso a nivel de especie; lo que de igual forma se evidencia en el caso de la posición divergente o en sentido contrario de la transcripción de los genes codificantes para

proteínas del tipo MarR; acerca de esto, Wilkinson y Grove en 2006 destacan que la mayoría de los miembros de esta familia son capaces de regular a los genes que se encuentran dentro de los operones a los que pertenecen, así como también que pueden regular a genes codificados de forma divergente, aunque cabe resaltar que también existen muchas excepciones a este comportamiento, hecho que nos permite realizar hipótesis acerca de la forma de regulación de cada gen *marR* encontrado en *A. brasilense* Sp7, puesto que incluso en el caso de MibR, aunque no pertenece a algún operón, se observa en una posición divergente a otro gen, lo que pudiese indicar su posible función en la regulación del mismo.

Algunas de las proteínas MarR de *A. brasilense* Sp7 fueron encontradas cercanas a transportadores celulares, diferentes autores señalan que existen casos en los que las proteínas MarR, con esta condición en su contexto genético, son encargadas de la regulación de dichos transportadores celulares, tal es el caso de FarR de *Neisseria gonorrhoeae*, MepR de *Staphylococcus aureus*, MexR de *Pseudomonas aeruginosa* e incluso MarR de *E. coli*, dado que las proteínas de esta familia están involucradas en la resistencia a múltiples drogas (Arshad *et al.*, 2016; Choudhury *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2003; Folster y Shafer, 2005; Schindler *et al.*, 2013), sin embargo, también existen miembros MarR que no poseen transportadores celulares cercanos sin que esto tenga alguna relevancia a nivel biológico, e incluso existen genes *marR* que, aunque se encuentren cerca de genes codificantes para bombas de flujo, pueden no regular a dichas bombas como es el caso de SlyA de *Salmonella typhimurium* (Will y Fang, 2020); lo que puede explicar el que se hayan encontrado genes cercanos a bombas de flujo celular y genes que no lo están, esto es interesante porque incluso dentro de la misma bacteria estos miembros parecen ser completamente diferentes entre sí, corroborando que se necesita más investigación acerca de dichas proteínas para saber si son capaces de regular a los transportadores que poseen cerca o no, dado que se ha observado también que las mutaciones generadas en miembros MarR afectan significativamente la resistencia a antibióticos (Air *et al.*, 1995).

El hecho de encontrar a otros genes MarR cercanos unos de otros en su contexto genético, ya ha sido observado en el operón *marRAB* y en el gen *marC* de *E.coli*, en donde MarA y MarR son reguladores transcripcionales, que a su vez son regulados por la proteína codificada por el gen *marR* (Martin y Rosner, 1995; Perera y Grove, 2010); debido a ello habrá que hacer más análisis acerca de los dos genes *marR* encontrados cerca en el contexto genético en el genoma de *A. brasilense* Sp7, dado que se sabe que las proteínas MarR que se encuentran divergentes a un operón son encargadas por lo general de regularlo además de regularse así mismas, lo cual podría estar sucediendo en este caso (Perera y Grove, 2010).

En cuanto al alineamiento de las proteínas MarR encontradas en el genoma de *A. brasilense* Sp7 hay que destacar que la mayor parte de los aminoácidos conservados lo son también para las tres proteínas más parecidas conforme a estructura terciaria con MibR, dicha conservación se ha reportado en la literatura como importante para mantener el plegamiento de estas proteínas (Gajiwala y Burley, 2000) sin embargo, también se observó la conservación de aminoácidos que solo se encontraron en las proteínas de *A. brasilense*, específicamente en la beta plegada 1, en donde se reconoce conservación en la mayor parte de la estructura, esto es interesante porque incluso entre los miembros MarR de la misma bacteria estudiada, esta beta plegada también puede no conservarse, ejemplo de esto se halla en las 8 proteínas MarR que posee *Mycobacterium tuberculosis* las cuales muestran una conservación de aminoácidos mucho mayor en las hélices número 5 y 6 (Gong *et al.*, 2019), lo cual es de destacarse puesto que en *A. brasilense* estas hélices son las que menos conservación muestran. Con estas observaciones, resulta interesante este cambio en la conservación de aminoácidos en estructuras específicas puesto que otro estudio publicado por Booth y su equipo de trabajo en 2019 demuestran que, en algunas bacterias homologas, en este caso que comparten la misma clase taxonómica, pueden mostrar una estricta conservación de los aminoácidos que interactúan con el ligando siempre que tengan el mismo gen regulado por la proteína MarR en cuestión (Jiménez *et al.*, 2008 y 2011).

Es de esperarse el haber encontrado información muy variada y/o incompleta acerca de las proteínas MarR que pueden unirse a distintos ligandos, dado que no se han reportado cristales de más proteínas, ni mucho menos que hayan sido caracterizados con cada uno de sus ligandos, lo cual deja una brecha de estudio grande para comprender mejor el modo de unión de los miembros de esta familia.

Aunque las proteínas fueron agrupadas por función específica ya sea de respuesta a estrés, virulencia o catabolismo de compuestos aromáticos, hay una notable preferencia de las mismas por la unión de moléculas aromáticas, lo cual ya se ha reportado para muchos miembros, por lo que se ha hipotetizado que el ligando ancestral de estas proteínas pudiesen ser los carboxilatos aromáticos como lo son en Arqueas, lo que también se puede corroborar en la información encontrada para BldR, MTH313 y ST1710 (Will y Fang, 2020). Sin embargo, también se encontraron proteínas que no poseen ligandos aromáticos, lo que tampoco es raro en esta familia de reguladores ya que también se conoce que pueden modificar su actividad por la unión de otras moléculas siempre que existan modificaciones covalentes como la oxidación de una cisteína, lo cual pudiera ocurrir en el caso de los compuestos no fenólicos encontrados. Los hallazgos acerca de los genes regulados en operones por estas proteínas, así como su función como activadores o represores también coincidió con lo reportado en la literatura (Perera y Groove, 2010; Davis *et al.*, 2013; Booth *et al.*, 2019; Stevenson *et al.*, 2013; Bordelon *et al.*, 2006; Cogan *et al.*, 2018; Dolan *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2017; Stevenson *et al.*, 2007)

El no encontrar sitios conservados de unión al ligando entre las proteínas encontradas en esta revisión, ha complicado el estudio de estos miembros. Esta variación en cuanto a los aminoácidos que interactúan con su ligando ha permitido que los mismos se unan a una gran cantidad de compuestos distintos. Además, hay que analizar con cuidado los datos en los que se encontraron cristales MarR unidos a salicilato dado que se ha visto que este no es el ligando natural de los miembros MarR, por lo que al superponer a las proteínas unidas con dicho ligando y las no unidas, no se observan cambios relevantes que puedan explicar cómo estas

proteínas se disocian del ADN para cumplir su función (Saridakis *et al.*, 2008; Kumarevel *et al.*, 2009; Perera y Groove, 2010). Por otro lado, el hecho de observar en las proteínas ya descritas el mismo tipo de interacciones dentro de las que se han encontrado los puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals, puede abrirnos paso a dilucidar cómo podrían funcionar este tipo de uniones en MibR, sin embargo, es preciso analizar la unión de esta proteína con su ligando determinado en condiciones de laboratorio o incluso realizando un modelado utilizando un cristal que ya posea unido al AIA. Conforme a lo anterior, por ejemplo, se ha demostrado la unión de la proteína LacR miembro de la familia MarR, con la molécula AIA, lo que repercute en la unión de dicha proteína con su región promotora en *Acinetobacter baumannii* (Shu *et al.*, 2015). Dicho estudio es interesante puesto que apoya la hipótesis inicial de este trabajo en donde AIA podría actuar como ligando de AIA en *A. brasilense* Sp7.

Además, fue interesante el encontrar proteínas que no utilizan las estructuras comprendidas en su dominio HTH para unirse a sus ligandos, si no que se pueden encontrar también aquellas que interactúen con la hélice número 1, que en este trabajo se dejó en su mayor parte fuera de los alineamientos realizados con el resto de miembros de la familia MarR a manera de dirigir la búsqueda de aminoácidos conservados que pudiesen unirse a ligando, sin embargo, estudios futuros pudieran considerar también a esta hélice dada la importante participación que puede tener en la interacción con los ligandos en proteínas de las que si se han caracterizado cristales en la plataforma PDB.

## CONCLUSIONES

- La proteína MibR tiene una estructura terciaria conformada de 6  $\alpha$ - hélices y 2  $\beta$ - plegadas.
- El dominio HTH de MibR va del aminoácido 50 al 150, lo que representa toda la estructura protéica excepto la mayor parte de las hélices 1 y 6.
- A nivel de estructura primaria existe una identidad menor al 31% entre los miembros identificados en la base de datos de proteínas.
- MibR comparte identidad con ciertos aminoácidos presentes en las alfa hélices 1, 2, 4 y 5 de las proteínas CouR, PcaV y BpsR.
- Existen 15 posibles proteínas de la familia MarR codificadas en el genoma de *A. brasilense* Sp7 y estas conservan aminoácidos de la beta plegada número 1.
- Las estructuras encontradas en la revisión bibliográfica poseen únicamente 3 tipos de plegamiento consistentes en 6  $\sigma$ -hélices y 2  $\beta$ - plegadas, 6  $\sigma$ -hélices y 3  $\beta$ - plegadas y 7  $\sigma$ -hélices y 3  $\beta$ - plegadas.

## PERSPECTIVAS

En el futuro se recomienda continuar con los análisis de interacción entre la proteína MibR y la región intergénica del gen *ipdC*. Así como probar si MibR tiene como ligando al AIA, lo cual puede realizarse experimentalmente, a través de ensayos de EMSA y/o de docking molecular, para lo cual sería necesario contar con una proteína cristalizada en presencia de AIA. Por otro lado, se podrían realizar alineamientos que incluyan la totalidad de la alfa hélice considerando lo observado en la interacción a los ligandos de otras proteínas de la familia MibR. Finalmente, queda por investigar la manera en que MibR puede interactuar en el promotor de *ipdC* junto con LibR para complementar el mecanismo de regulación del gen *ipdC*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abel, S., & Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. *Plant physiology*, 111(1), 9.
2. Air KW, Martin RG, Rosner JL, Fujita N, Ishihama A, Wolf RE Jr. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J Bacteriol.* 1995;177:7100–7104.
3. Alekshun M.N., Levy S.B., Mealy T.R., Seaton B.A., and Head J.F. (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 8, 710–714.
4. Alekshun, M.N., Kim, Y.S., and Levy, S.B. (2000) Mutational analysis of MarR, the negative regulator of *marRAB* expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. *Mol. Microbiol.* 35, 1394–1404.
5. Alekshun M.N., Levy S.B., Mealy T.R., Seaton B.A., and Head J.F. (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* 8, 710–714.
6. Andrew J. Donati, Hae-In Lee, Johan H. J. Leveau, and Woo-Suk Chang. (2013). Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 8:e76559.
7. Arshad M, Goller CC, Pilla D, Schoenen FJ, Seed PC. (2016) Threading the needle: Small-molecule targeting of a xenobiotic receptor to ablate *Escherichia coli* polysaccharide capsule expression without altering antibiotic resistance. *J Infect Dis* ;213:1330–1339.
8. Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.
9. Bianco C, Imperlini E, Defez R. (2009). Legumes like more IAA. *Plant Signal Behav* 4:763-765.

10. Booth, W. T., Davis, R. R., Deora, R., & Hollis, T. (2019). Structural mechanism for regulation of DNA binding of BpsR, a *Bordetella* regulator of biofilm formation, by 6-hydroxynicotinic acid. *Plos one*, 14(11), e0223387.
11. Brewer, S., Tolley, M., Trayer, I.P., Barr, G.C., Dorman, C.J., Hannavy, K., Higgins, C.F., Evans, J.S., Levine, B.A., Wormald, M.R., (1990). Structure and function of X-Pro dipeptide repeats in the TonB proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 216, 883–895. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(99\)80008-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(99)80008-4)
12. Carreño-López, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., and Baca, B. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.* 264:521-530.
13. Camino, N. (2004). Neumonía por *Bordetella bronchiseptica* en pacientes con infección por el VIH. *Enferm. infecc. microbiol. clín.(Ed. impr.)*, 502-503.
14. Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., & Acosta Echevarría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*, vol. 27, 2005.
15. Chang YM, Chen CK, Ko TP, Chang-Chien MW, Wang A. (2013) Structural analysis of the antibiotic-recognition mechanism of MarR proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 69:1138-1149.
16. Choudhury D, Ghose A, Dhar Chanda D, et al. (2016) Premature termination of MexR leads to overexpression of MexAB-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary referral hospital in India. *PLoS One*;11:e0149156.
17. Cogan, D. P., Baraquet, C., Harwood, C. S., & Nair, S. K. (2018). Structural basis of transcriptional regulation by CouR, a repressor of coumarate catabolism, in *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(30), 11727-11735.

18. Davis, J. R., Brown, B. L., Page, R., & Sello, J. K. (2013). Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic acids research*, 41(6), 3888-3900.
19. Donati AJ, Lee HI, Leveau JH, Chang WS (2013) Effects of indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. PLoS ONE 8:e76559
20. Fendrihan, S., Constantinescu, F., Siciua, O., & Dinu, S. (2017). strains as biofertilizers and biocontrol agents-a practical review.
21. Folster JP, Shafer W. (2005) Regulation of mtrF expression in *Neisseria gonorrhoeae* and its role in high-level antimicrobial resistance. *J Bacteriol* ;187:3713–3720.
22. Gajiwala, K.S. and Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 110–116.
23. Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of bacteriology*, 188(12), 4169-4182.
24. Gong, Z., Li, H., Cai, Y., Stojkoska, A., & Xie, J. (2019). Biology of MarR family transcription factors and implications for targets of antibiotics against tuberculosis. *Journal of cellular physiology*, 234(11), 19237-19248.
25. Hamilton S, Bongaerts R, Mulholland F, Cochrane B, Porter J, Lucchini S, Lappin-Scott HM, Hinton JC. 2009. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics* 10:599.
26. Healy, C., Golby, P., MacHugh, D. E., & Gordon, S. V. (2016). The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase. *Tuberculosis*, 97, 154-162.
27. Hong M, Fuangthong M, Helmann JD, Brennan R. (2005). Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell*, 20:131-141.

28. Idris E, Iglesias D, Talon M, Borriss R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact.* 20:619-26.
29. Jijón, 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 de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
30. Jiménez JI, Juárez JF, García JL, Díaz E. (2011). A finely tuned regulatory circuit of the nicotinic acid degradation pathway in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*; 13: 1718–1732. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02471.x> PMID: 21450002
31. Jiménez JI, Canales A, Jiménez-Barbero J, Ginalski K, Rychlewski L, García JL, et al. (2008). Deciphering the genetic determinants for aerobic nicotinic acid degradation: the nic cluster from *Pseudomonas putida* KT2440. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 105: 11329–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802273105> PMID: 18678916
32. Kazan K, Manners JM. (2009). Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14:373-382.
33. Kepinski, S., & Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041), 446-451.
34. Kumarevel, T., Tanaka, T., Umehara, T., & Yokoyama, S. (2009). ST1710–DNA complex crystal structure reveals the DNA binding mechanism of the MarR family of regulators. *Nucleic acids research*, 37(14), 4723-4735.
35. Lee EH, Rouquette-Loughlin C, Folster JP, Shafer W. (2003). FarR regulates the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* via an MtrR regulatory mechanism. *J Bacteriol*; 185:7145–7152.
36. Leoni L, Ascenzi P, Bocedi A et al (2003) Styrene-catabolism regulation in *Pseudomonas fluorescens* ST: phosphorylation of StyR induces dimerization and cooperative DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* 303:926–931
37. Martin, R. G., Nyantakyi, P. S., & Rosner, J. L. (1995). Regulation of the multiple antibiotic resistance (mar) regulon by marORA sequences in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(14), 4176-4178.

38. Mai X, Adams MW. (1994). Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *J Biol Chem* 269:16726-16732.
39. 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. *Environ Microbiol* 10:1365–1373
40. Martin, RG, Rosner, JL. (1995). Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5456-5460.
41. Mattsson J, Ckurshumova W, Berleth T. (2003). Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol* 131:1327-1339.
42. Molina-Favero C., Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S., Lamattina L (2008) Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato *MPMI* ; 21 (7) :1001-1009.
43. Ntountoumi, C., Vlastaridis, P., Mossialos, D., Stathopoulos, C., Iliopoulos, I., Promponas, V., & Amoutzias, G. D. (2019). Low complexity regions in the proteins of prokaryotes perform important functional roles and are highly conserved. *Nucleic acids research*, 47(19), 9998-10009.
44. Omay SH, Schmidt WA, Martin P, Bangerth F. (1993). Indole acetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under *in vitro* conditions. *Can J Microbiol* 39:187-192.
45. Patten ChL. & Glick BR. (1996). Bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid (review). *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
46. Patten CL, Blakney AJ, Coulson TJ. (2012). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Crit Rev Microbiol* 39:395-415.
47. Perera IC, Grove A. (2010). Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J Mol Cell Biol* 2:243-254.

48. Piccoli P, Masciarelli O, Bottini R (1996) Metabolism of 17,17- [2H<sub>2</sub>]-gibberellins A4, A9 and A20 by *Azospirillum lipoferum* in chemically-defined culture medium. *Symbiosis* 21:263-274.
49. Pittard, J., Camakaris, H., and Yang, J. (2005). The TyrR regulon. *Mol. Microbiol.* 55, 16–26. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04385.x
50. Plate L, Marletta M. (2013). Phosphorylation-dependent derepression by the response regulator HnoC in the *Shewanella oneidensis* nitric oxide signaling network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4648-4657.
51. Pollmann S, Müller A, Weiler EW. (2006). Many roads lead to “auxin”: of nitrilases, synthases, and amidases. *Plant Biol* 8:326-333.
52. Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:609-615.
53. Puyvelde SV, 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* 62:723-728.
54. Religa T, Johnson C, Vu D, Brewer S, Dyer R, Fersht A (2007). The helix-turn-helix motif as an ultrafast independently folding domain: the pathway of folding of Engrailed homeodomain "*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104 (22): 9272–7.
55. Rohs R, West SM, Sosinsky A, Liu P, Mann RS, Honig B. (2009). The role of DNAshape in protein-DNA recognition. *Nature*, 461:1248-1253.
56. Rothballer M, Schmid M, Fekete A, Hartmann A. (2005). Comparative in situ analysis of ipdC-gfpmut3 promoter fusions of *Azospirillum brasilense* Sp7 and Sp245. *Environ Microbiol* 7:1839–1846
57. Rouanet, C., Reverchon, S., Rodionov, D.A., and Nasser, W. (2004). Definition of a consensus DNA-binding site for PecS, a global regulator of virulence gene expression in *Erwinia chrysanthemi* and identification of new members of the PecS regulon. *J Biol Chem* 279:30158-30167.

58. Ryu, R. J., & Patten, C. L. (2008). Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7200-7208.
59. Saridakis, V., Shahinas, D., Xu, X., and Christendat, D. (2008). Structural insight on the mechanism of regulation of the MarR family of proteins: high-resolution crystal structure of a transcriptional repressor from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Mol. Biol.* 377, 655–667.
60. Schindler BD, Seo SM, Jacinto PL, et al. (2013). Functional consequences of substitution mutations in MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* mepA multidrug efflux pump gene. *J Bacteriol*;195:3651–3662.
61. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 5857-5864.
62. Sergeeva, E., Liaimer, A. & Bergman, B., (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*, 215(2), pp.229–238.
63. Shu HY, Lin LC, Lin TK, Chen HP, Yang HH, Peng KC, Lin GH. (2015). Transcriptional regulation of the *iac* locus from *Acinetobacter baumannii* by the phytohormone indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek* 107:1237-1247.
64. Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., & Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312(1-2), 15-23.
65. Steenhoudt O y Vanderleyden, J (2000) *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487–506.
66. Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(11), 847-859.

67. Thomashow, L. S., Reeves, S., & Thomashow, M. F. (1984). Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(16), 5071-5075.
68. van Aalten, D.M., DiRusso, C.C., and Knudsen, J. (2001) The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J.* 20, 2041–2050.
69. 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. *Mol Plant Microbe Interact* 18:311-323.
70. Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y. (2010). Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor* *Funct Integr Genomics* 10:533-546.
71. Weijers, D., & Jürgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: the ends in sight?. *Current opinion in plant biology*, 8(1), 32-37.
72. Wilkinson, S. P., & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current issues in molecular biology*, 8(1), 51-62.
73. Will, W. R., & Fang, F. C. (2020). The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. *Current opinion in microbiology*, 55, 1-8.
74. Wintjens R, Rooman M (1996). "Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes". *Journal of Molecular Biology*. 262 (2): 294–313.
75. Wisniewski-Dyé F, Lozano L, Acosta-Cruz E, Borland S, Drogue B, Prigent-Combaret C, Rouy Z, Barbe V, Mendoza-Herrera A, González V, Mavingui P. (2012). Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes* 3:576-602.

76. Wojciak, J.M., Iwahara, J., and Clubb, R.T. (2001) The Mu repressor-DNA complex contains an immobilized 'wing' within the minor groove. *Nature Struct. Biol.* 8, 84–90.
77. Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research*, 43(W1), W174-W181.
78. Yu, G., Hui, M., Li, R., & Zhang, S. (2020). Pleiotropic regulation of daptomycin synthesis by DptR1, a LuxR family transcriptional regulator. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1-12.
79. Zhang Q, Chen Q, Zhuang S, Chen Z, Wen Y, Li J (2015) A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus*. *Appl Environ Microbiol* 81:3753–3765. <https://doi.org/10.1128/AEM.00057-15>
80. Zheleznova Heldwein, E.E. and Brennan, R.G. (2001) Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature* 409, 378–382.
81. Zhou Y., Wei W., Wang X., Xu L., Lai R. (2009) *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China *J. Gen. Appl. Microbiol.*;551-7.
82. Zhu R, Hao Z, Lou H, Song Y, Zhao J, Chen Y, Zhu J, Chen P. (2017). Structural characterization of the DNA-binding mechanism underlying the copper(II)-sensing MarR transcriptional regulator. *J Biol Inorg Chem*, 22:685-693.
83. Zhu, D., Wang, Y., Zhang, M., Ikeda, H., Deng, Z., & Cane, D. E. (2013). Product-mediated regulation of pentalenolactone biosynthesis in *Streptomyces* species by the MarR/SlyA family activators PenR and PntR. *Journal of bacteriology*, 195(6), 1255-1266.
84. Zimmer W, Bothe H (1988) The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat. *Plant Soil* 110:239–247.
85. Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649.

86. Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 581-586.
87. Alemneh, A. A., Cawthray, G. R., Zhou, Y., Ryder, M. H., & Denton, M. D. (2021). Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. *Archives of Microbiology*, 203(7), 3825-3837.
88. Davis, J. R., Brown, B. L., Page, R., & Sello, J. K. (2013). Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligand-responsive MarR family transcription factors. *Nucleic acids research*, 41(6), 3888-3900.
89. Booth, W. T., Davis, R. R., Deora, R., & Hollis, T. (2019). Structural mechanism for regulation of DNA binding of BpsR, a *Bordetella* regulator of biofilm formation, by 6-hydroxynicotinic acid. *Plos one*, 14(11), e0223387.
90. Stevenson, C. E., Assaad, A., Chandra, G., Le, T. B., Greive, S. J., Bibb, M. J., & Lawson, D. M. (2013). Investigation of DNA sequence recognition by a streptomycete MarR family transcriptional regulator through surface plasmon resonance and X-ray crystallography. *Nucleic acids research*, 41(14), 7009-7022.
91. Bordelon, T., Wilkinson, S. P., Grove, A., & Newcomer, M. E. (2006). The crystal structure of the transcriptional regulator HucR from *Deinococcus radiodurans* reveals a repressor preconfigured for DNA binding. *Journal of molecular biology*, 360(1), 168-177.
92. Cogan, D. P., Baraquet, C., Harwood, C. S., & Nair, S. K. (2018). Structural basis of transcriptional regulation by CouR, a repressor of coumarate catabolism, in *Rhodopseudomonas palustris*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(30), 11727-11735.
93. Dolan, K. T., Duguid, E. M., & He, C. (2011). Crystal structures of SlyA protein, a master virulence regulator of *Salmonella*, in free and DNA-bound states. *Journal of biological chemistry*, 286(25), 22178-22185.

94. Peng, J. W., Yuan, H., & Tan, X. S. (2017). Crystal structure of the multiple antibiotic resistance regulator MarR from *Clostridium difficile*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 73(6), 363-368.
95. Stevenson, C. E., Kock, H., Mootien, S., Davies, S. C., Bibb, M. J., & Lawson, D. M. (2007). Crystallization and preliminary X-ray analysis of AbsC, a novel regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 63(3), 233-235.
96. Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8607-8619.
97. Costacurta, A., & Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 21(1), 1-18.