



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

El componente periplásmico del transportador DctPQM de *Rhodobacter sphaeroides*, es esencial para la activación del sistema de dos componentes DctSR, en respuesta a la presencia de ácidos C4-dicarboxílicos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Verónica Jazmín Sánchez Ortiz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: Dr. Georges Dreyfus Cortés
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Dr. Luis Servín González
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

El componente periplásmico del transportador DctPQM de *Rhodobacter sphaeroides*, es esencial para la activación del sistema de dos componentes DctSR, en respuesta a la presencia de ácidos C4-dicarboxílicos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Verónica Jazmín Sánchez Ortiz

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: Dr. Georges Dreyfus Cortés
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Dr. Luis Servín González
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/399/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de marzo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **SÁNCHEZ ORTIZ VERÓNICA JAZMÍN** con número de cuenta **99311111** con la tesis titulada **“El componente periplásmico del transportador DctPQM de *Rhodobacter sphaeroides*, es esencial para la activación del sistema de dos componentes DctSR, en respuesta a la presencia de ácidos C4-dicarboxílicos”**, bajo la dirección de la **DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA**, Tutora Principal, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
Vocal: DRA. IRMA ROMERO ÁLVAREZ
Vocal: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
Vocal: DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA
Secretario: DR. GEORGES DREYFUS CORTÉS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de becario 255115).

A la DGAPA- PAPIIT (IG200420) por el financiamiento parcial de este proyecto.

Al PAEP por el apoyo otorgado para asistir al V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias.

A mi directora de tesis, la Doctora Rosa Laura Camarena Mejía.

Al Dr. George Dreyfus Cortés y al Dr. Luis Servín González, miembros de mi Comité Tutoral. Gracias a sus acertadas observaciones y gran experiencia enriquecieron este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Dra. Laura Camarena, que me mostro y compartió su amor por la ciencia, su dedicación y su entereza para la formación de investigadores. Es una fuente de inspiración para mí. Gracias por haberme permitido ser parte de su grupo.

A los miembros del Comité Sinodal por sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Sebastian Poggio, la Dra. Clelia Domenzain y a la QFB. Aurora Osorio por su invaluable apoyo académico, técnico y emocional.

Al Dr. Javier de la Mora, a la Dra. Teresa Ballado Nava, a la Dra. Norma Silvia Sánchez Sánchez y al Dr. Antonio Peña Díaz por todo el apoyo técnico brindado.

Gracias a todos mis compañeros y amigos de laboratorio que hicieron de mi paso por el *Rhodo-Caulo* Lab fuera una de las mejores etapas de mi vida. Disfrute mucho conocerlos, verlos crecer, cada risa y cada palabra de aliento. Muchas gracias también por todo su apoyo y consejos técnicos y académicos. Los admiro mucho. Como diría José Hernández Valle “más que compañeros, son familia”.

Dedicatoria

Especialmente a mi amada madre, Eva, tu luz me acompaña siempre, eres mi motor, mi todo.

Padre Javier, gracias por brindarme la oportunidad de estudiar a pesar de las adversidades.

A Andrés González por todo lo aprendido en estos años, por tu apoyo, amor y compañía.

“¡Qué extrañas criaturas son los hermanos!” Jane Austin

Mis amados hermanos, Brisa, Eva, Javis y Karlita, ha sido toda una aventura poder compartir la vida con ustedes. Son parte de mi ser.

A Fernando, Jordan, Tadeo, Sofía y Rebeca los amo con todo mi corazón, indudablemente son el mejor regalo que mis hermanos pudieron darme.

A José María González, gracias por todo el apoyo. Lo estimo mucho.

A mis amados compañeros Dante y Cora.

Índice

Abreviaturas

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Versatilidad metabólica de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas	3
Cadena de transporte de electrones en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas	3
Cadena de transporte de electrones aeróbica	4
Fotosíntesis y la cadena de transporte de electrones anaeróbica	4
Metabolismo central del carbono en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas.....	7
¿Cómo las bacterias seleccionan la fuente de carbono que consumirán?	8
Ácidos C4-dicarboxílicos	9
Transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos	10
Familia de transportadores periplásmicos tripartitas independientes de ATP	14
Sistemas de dos componentes	17
Dominios sensores de las cinasas de histidina.....	19
Sistemas de dos componentes que regulan la expresión de los transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos	19
Sistemas transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos que participan en la transducción de señales20	
Antecedentes	23
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23
Metabolismo central del carbono en <i>R. sphaeroides</i>	24
Ácidos C4-DCB en el metabolismo de <i>R. sphaeroides</i>	27
Proteínas transportadoras codificadas en el genoma de <i>R. sphaeroides</i>	27
Hipótesis	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares.....	32
Métodos	33
Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	33
Métodos microbiológicos	37
Métodos de biología molecular	40
Métodos bioquímicos e inmunológicos	48
Análisis bioinformático	52
Resultados	54
Homólogos de transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos en <i>R. sphaeroides</i>	54

Los transportadores tipo TRAP en <i>R. sphaeroides</i>	56
Características del sistema DctPQM y DctSR de <i>R. sphaeroides</i>	60
DctPQM es el principal transportador de ácido succínico activo en <i>R. sphaeroides</i>	63
El crecimiento heterotrófico de <i>R. sphaeroides</i> en ácido succínico requiere de una alta expresión del sistema transportador DctPQM.....	65
El incremento en la expresión de DctPQM limita el crecimiento fotosintético.....	67
En ausencia de DctPQM es posible obtener mutantes supresoras secundarias que restauran el crecimiento en MMS con C4-DCB	69
El papel del sistema DctSR en la regulación de la expresión de <i>dctPQM</i>	70
La ausencia de DctR y de DctS provoca una disminución del crecimiento en MMS suplementado con C4-DCB.....	71
En ausencia de DctSR hay una reducción de la concentración de DctPQM.....	75
Se requiere de DctSR para la óptima expresión de <i>dctPQM</i>	76
DctPQM se requiere para una inducción completa del operón <i>dctPQM</i>	78
DctP-succínico activa al sistema DctSR	79
Análisis del dominio periplásmico de DctS. Comparación de la estructura de los dominios sensores de las cinasas de histidina	82
La expresión de <i>dctSR</i> es independiente de DctR.....	86
DctR se une a la región regulatoria de <i>dctPQM</i>	87
Predicción del motivo de unión de DctR	88
Predicción de algunos blancos de DctR	92
Discusión	94
Conclusiones	102
Perspectivas	102
Anexos	103
Referencias Bibliográficas	110
Artículo publicado	122

Abreviaturas

Ace	Acetato
AceTr	Transportador de acetato
ATP	Adenosín trifosfato
BFPNS	Bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas
Bph	Bacteriofeofitina
CA	Dominio catalítico o dominio de unión a ATP de las cinasas de histidina
Cas	Casaminoácidos
CBB	Ciclo de Calvin-Benson-Bassham
CCR	Represión por catabolitos de carbono
CCS	Familia de transportadores simporte de citrato: catión
Cit	Citrato/ ácido cítrico
CitMHS	Familia de transportadores simporte de citrato-Mg ²⁺ : H ⁺ -citrato: H ⁺
DAACS	Familia de transportadores simporte de dicarboxilatos/ aminoácidos y Na ⁺ o H ⁺
DASS	Familia de transportadores simporte de aniones divalentes: Na ⁺
DBD	Dominio de unión a DNA del regulador de respuesta
DHp	Dominio de dimerización de las cinasas de histidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ED	Ruta Entner-Doudoroff
EMP	Ruta Embden-Meyerhof-Parnas
EMSA	Retardo en la movilidad electroforética
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido en su forma reducida
Fum	Fumarato/ Ácido fumárico
GTP	Guanosín trifosfato
HK	Cinasa de histidina
HTM	Hélices transmembranales
LB	Medio rico
LHI y LHII	Complejos cosechadores de luz
Mal	Malato/ Ácido málico
MMS	Medio mínimo Siström
MU	4 metilumbeliferona
MUG	4-metilumbeliferil-β-D-glucurónido
N₂O	Óxido de nitrógeno (I)
NADH₂	Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida
NADH-DH	NADH-deshidrogenasa

Ni-NTA	Columna de afinidad cuya matriz es de níquel acoplado a ácido nitriloacético
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAS	Dominio sensor encontrado por primera vez en las proteínas Per-ARNT-Sim
PAS_c	Dominio PAS citoplásmico
PAS_p	Dominio PAS periplásmico
PHB	Polihidroxibutirato
Pi	Grupo fosforilo
PPP	Vía pentosa- fosfato
Qxt	Quinol oxidasas
RC	Centro de reacción
REC	Dominio receptor
RR	Regulador de respuesta
SBP	Proteína de unión a ligando
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
Suc	Succinato/ Ácido succínico
Succ-DH	Succinato deshidrogenasa
Tar	Tartrato
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TRAP	Transportador periplásmico tripartita independiente de ATP
TTT	Transportador tripartita de tricarbóxicos
UQ_A / UQ_B	Ubiquinona A / Ubiquinona B
UQH₂	Poza de hidroxibiquinonas

Resumen

Rhodobacter sphaeroides es una alfaproteobacteria que tiene la capacidad de crecer heterotróficamente y fotoheterotróficamente usando una amplia gama de fuentes de energía, de carbono y de poder reductor, pero los ácidos C4-dicarboxílicos (C4-DCB) succínico, málico o fumárico suelen ser adicionados en el medio de cultivo porque son rápidamente metabolizados y sustentan los diferentes tipos de crecimiento de esta especie. Diversos transportadores de C4-DCB han sido reportados en bacterias, uno de ellos es el sistema DctPQM de *Rhodobacter capsulatus* que es esencial para su crecimiento heterotrófico, pero no para el crecimiento fotoheterotrófico cuando la fuente de carbono es un ácido C4-dicarboxílico. Estructuralmente el sistema Dct está formado por las proteínas integrales de membrana DctQ y DctM y por la proteína periplásmica de unión a ligando DctP. En la parte regulatoria del sistema Dct se encuentra la cinasa de histidina DctS y el regulador de respuesta DctR, este último regula la expresión del operón *dctPQM* en respuesta a la concentración de C4-DCB en el medio.

El objetivo de este proyecto fue el caracterizar los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión del operón *dctPQM* en *R. sphaeroides*. Para ello se construyó la triple mutante Δ *dctPQM* y se evaluó su capacidad para crecer heterotrófica y fotoheterotróficamente. Se determinó que este sistema transportador es esencial para permitir ambas formas de crecimiento cuando los ácidos succínico o málico son la única fuente de carbono. También se determinó que, para permitir el crecimiento heterotrófico se requiere de una alta expresión de los genes *dctPQM* lo que asegura el transporte eficiente de estos C4-DCB. Sin embargo, durante el crecimiento fotoheterotrófico es necesaria la reducción de la actividad promotora de *dctPQM*, ya que la alta expresión de los genes que codifican para el transportador DctPQM limita el crecimiento fotoheterotrófico probablemente porque el incremento en el transporte de succinato (fuente de poder reductor) deriva en la saturación de los complejos respiratorios. Este proceso de sobrerreducción de la poza de quinonas fue revertido al agregar un aceptor de electrones alternativo.

En este trabajo se demostró que la proteína DctP es parte de la vía de señalización del sistema de dos componentes DctSR que da cuenta de la disponibilidad del ligando. En presencia de una alta concentración de ácido succínico, la activación de DctR provoca el incremento de la expresión de *dctPQM* de forma directa a través de su unión a la región de control de *dctPQM*. Aunque DctSR es necesario para incrementar la actividad transcripcional de *dctPQM*, no es esencial, ya que existe un bajo nivel de expresión de este operón que es independiente de DctR. Finalmente, se demostró que DctR no activa la transcripción de *dctSR*, pero sí se requiere para disminuir la expresión de este operón durante el crecimiento fotoheterotrófico.

Abstract

Rhodobacter sphaeroides can use C4-dicarboxylic acids to grow heterotrophically or photoheterotrophically. For *Rhodobacter capsulatus*, it was previously demonstrated that the DctPQM transporter system is essential to support growth using these organic acids under heterotrophic but not under photoheterotrophic conditions. DctM and DctQ are integral membrane proteins and DctP is the periplasmic ligand-binding protein DctP. The regulatory part of the Dct system consists of the histidine kinase DctS and the response regulator DctR.

The aim of this project was to determine the role of DctPQM on the growth of *R. sphaeroides* and elucidate how the expression of these genes is controlled. For this, the triple mutant Δ dctPQM was constructed and its ability to grow heterotrophically and photoheterotrophically was evaluated. Our data revealed that in *R. sphaeroides* this transporter system is essential for photoheterotrophic and heterotrophic growth when C4- dicarboxylic acids are used as carbon source. It was also determined that, to allow heterotrophic growth, a high expression of the *dctPQM* genes is required, which ensures the efficient transport of these C4-DCB. We also found that over-expression of *dctPQM* is detrimental for photoheterotrophic growth in the presence of succinic acid in the culture medium. In agreement with this, we observed a reduction of the *dctPQM* promoter activity in cells growing under these conditions, indicating that the amount of DctPQM needs to be reduced under photoheterotrophic growth. It has been reported that the two-component system DctS and DctR activates the expression of *dctPQM*. Our results demonstrate that in the absence of DctR, *dctPQM* is still expressed albeit at a low level. In this work, we also found that the periplasmic component of the transporter system, DctP, has a role in transport and also in signalling the DctS/DctR two-component system. Finally, it was shown that DctR does not activate *dctSR* transcription, but it is required to decrease the expression of this operon during photoheterotrophic growth.

Introducción

Versatilidad metabólica de bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas

Las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (BFPNS) son un conjunto de alfa-proteobacterias que utilizan una amplia variedad de estrategias metabólicas para desarrollarse en diversas condiciones ambientales. Se han encontrado en ecosistemas terrestres, ecosistemas acuáticos lénticos y lóticos; en hábitats marinos y salobres; en aguas residuales y en algunos ambientes extremos (Madigan, 2003; Madigan & Jung, 2009). La exposición a factores ambientales como oxígeno o luz, condicionan el tipo de crecimiento de estos organismos fotótrofos facultativos. Dependiendo de la fuente de energía, su crecimiento puede ser fototrófico (cuando utilizan la energía luminosa) o quimiotrófico (cuando obtienen la energía de la oxidación de compuestos orgánicos simples). De acuerdo con la fuente de carbono utilizada, el crecimiento puede ser autótrofo o heterótrofo. En el crecimiento autótrofo, el carbono se obtiene del CO₂ fijado anaeróbicamente por el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) y el poder reductor se obtiene del H₂ (Arai *et al.*, 2008; Madigan & Gest, 1979), mientras que en el crecimiento heterotrófico en la oscuridad diversos compuestos orgánicos simples pueden ser usados como fuente de carbono y poder reductor. Otra alternativa usada menos frecuentemente por algunas BFPNS es el crecimiento anaeróbico en la oscuridad al fermentar sus polisacáridos almacenados (Clayton y Sistrom, 1978). Así, estas proteobacterias pueden crecer, fotoautotróficamente (en anaerobiosis + luz + CO₂ + H₂), fotoheterotróficamente (en anaerobiosis + luz + compuestos orgánicos simples) o quimioheterotróficamente (en presencia de oxígeno + oscuridad + compuestos orgánicos simples o en anaerobiosis + oscuridad + polisacáridos).

Cadena de transporte de electrones en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas

En las membranas celulares de las bacterias se encuentran los complejos proteicos y los compuestos hidrofóbicos llamados quinonas relacionados con el transporte de electrones. En este proceso del transporte, además del flujo de electrones, también se genera un gradiente

de protones que será usado para diversas funciones celulares como la síntesis de ATP (por medio de la fosforilación oxidativa), para acoplar el transporte de ligandos, para la rotación del flagelo, etcétera (Eisenbach, 2015; Forrest *et al.*, 2011; Nath & Villadsen, 2015). Dependiendo del aceptor final, la cadena de transporte de electrones puede ser aeróbica, cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones o anaeróbica cuando otros compuestos como el nitrato, el sulfato o el DMSO son los agentes oxidantes. Los componentes y la dinámica de la cadena de transporte de electrones dependen de la especie y de las condiciones de crecimiento, pero en general, la poza de quinonas es reducida a ubiquinol a través del metabolismo central por enzimas como la succinato deshidrogenasa (Succ-DH) que transfiere 2 electrones a la ubiquinona después de oxidar el succinato a fumarato. Otras enzimas que pueden reducir a las ubiquinonas son la NADH-deshidrogenasa (NADH-DH) que cataliza la oxidación del NADH (Klamt *et al.*, 2008), la hidrogenasa o la sulfuro ubiquinol reductasa (Vermeiglio *et al.*, 2004).

Cadena de transporte de electrones aeróbica

En condiciones aeróbicas y en la oscuridad, las ubiquinonas transfieren los electrones donados por la Succ-DH o la NADH-DH al grupo prostético hemo del complejo citocromo *bc1*, este complejo también transloca protones a través de la membrana creando un gradiente electroquímico. Posteriormente, los electrones son donados al complejo citocromo soluble *c₂* o al complejo citocromo unido a membrana *C_y* y finalmente al oxígeno a través de las citocromo oxidasas tipo *cbb₃* (importante en condiciones de baja concentración de oxígeno) o tipo *aa₃* (relevante en concentraciones de alta concentración de oxígeno). La poza de quinonas también puede ser oxidada por las ubiquinol oxidasas, al transferir los electrones de las hidroquinonas al oxígeno evitando la sobrerreducción de estos compuestos (Arai *et al.*, 2008; Klamt *et al.*, 2008; White *et al.*, 2012a).

Fotosíntesis y la cadena de transporte de electrones anaeróbica

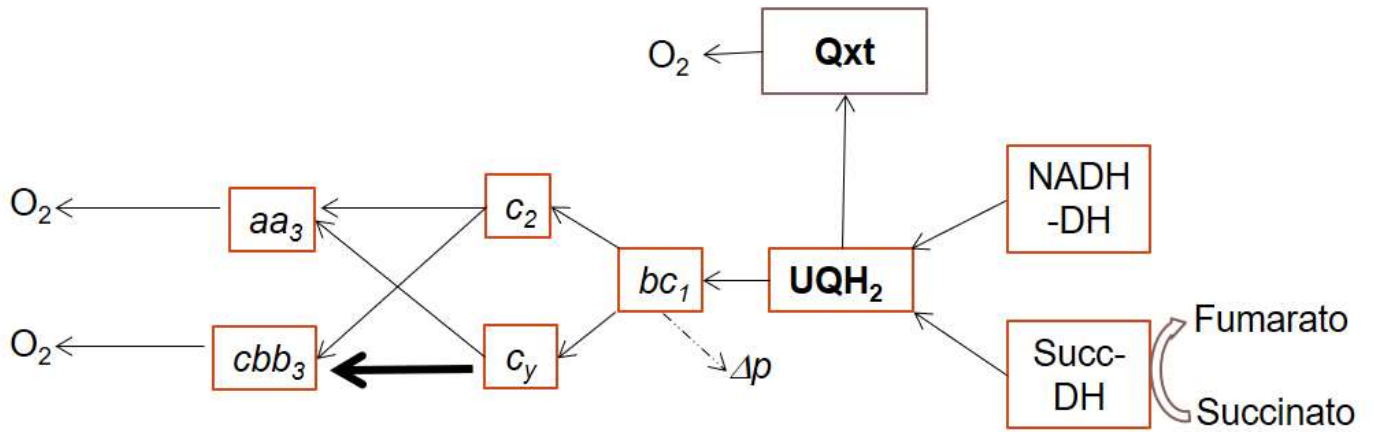
Las bacterias fotótrofas, en condiciones anóxicas o en bajas tensiones de oxígeno (> 3 %; Lemmer *et al.*, 2015) y en presencia de luz, desarrollan invaginaciones en la membrana interna llamadas cromatóforos, en donde se ubica el aparato fotosintético que consta de los dos complejos cosechadores de luz con sus pigmentos antena (LHI y LHII) y del centro de

reacción (RC). Además, en la membrana celular se encuentran los complejos respiratorios involucrados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Roh *et al.*, 2004). Durante la cadena de transporte de electrones fotosintética, la poza de quinonas es reducida por medio del metabolismo central a través de enzimas como la Succ-DH y la NADH-DH. Adicionalmente, las quinonas reciben electrones provenientes del aparato fotosintético, en donde:

La luz ($h\nu$) es cosechada por los pigmentos antena, posteriormente en el centro de reacción, esta luz excita a los electrones de la bacterioclorofila (P_{870}) llevándolos a un estado mayor de energía (P^*_{870}). En una serie de reacciones de óxido-reducción, los electrones activos son transferidos a un tipo de bacterioclorofila sin núcleo de magnesio llamada bacteriofeofitina (Bph), continúan hacia la ubiquinona A (UQ_A) y después a la ubiquinona B (UQ_B) que acepta 2 electrones. Cuando la UQ_B toma 2 protones del citoplasma sale del centro de reacción y se une a la poza de hidroxiquinonas (UQH_2) en la membrana celular. La quinona reducida transfiere sus electrones al complejo citocromo bc_1 . El flujo de electrones del ciclo Q en el complejo citocromo bc_1 lleva a la translocación de protones a través de la membrana. Los electrones se dirigen al complejo citocromo c_2 para regresar cíclicamente a la bacterioclorofila del centro de reacción (Klamt *et al.*, 2008; White *et al.*, 2012a, 2012b).

Es posible oxidar la poza de quinonas en presencia de aceptores de electrones alternativos, esta reacción es catalizada por las oxidorreductasas terminales y a este proceso se le conoce como respiración anaeróbica (Oh & Kaplan, 2000; White *et al.*, 2012b). En la figura 1 se ejemplifica el transporte de electrones en *R. sphaeroides*, en condiciones aeróbicas (1A) y en condiciones fotosintéticas (1B).

A) Cadena de transporte de electrones aeróbica



B) Cadena de transporte de electrones durante la fotosíntesis (condiciones anaeróbicas)

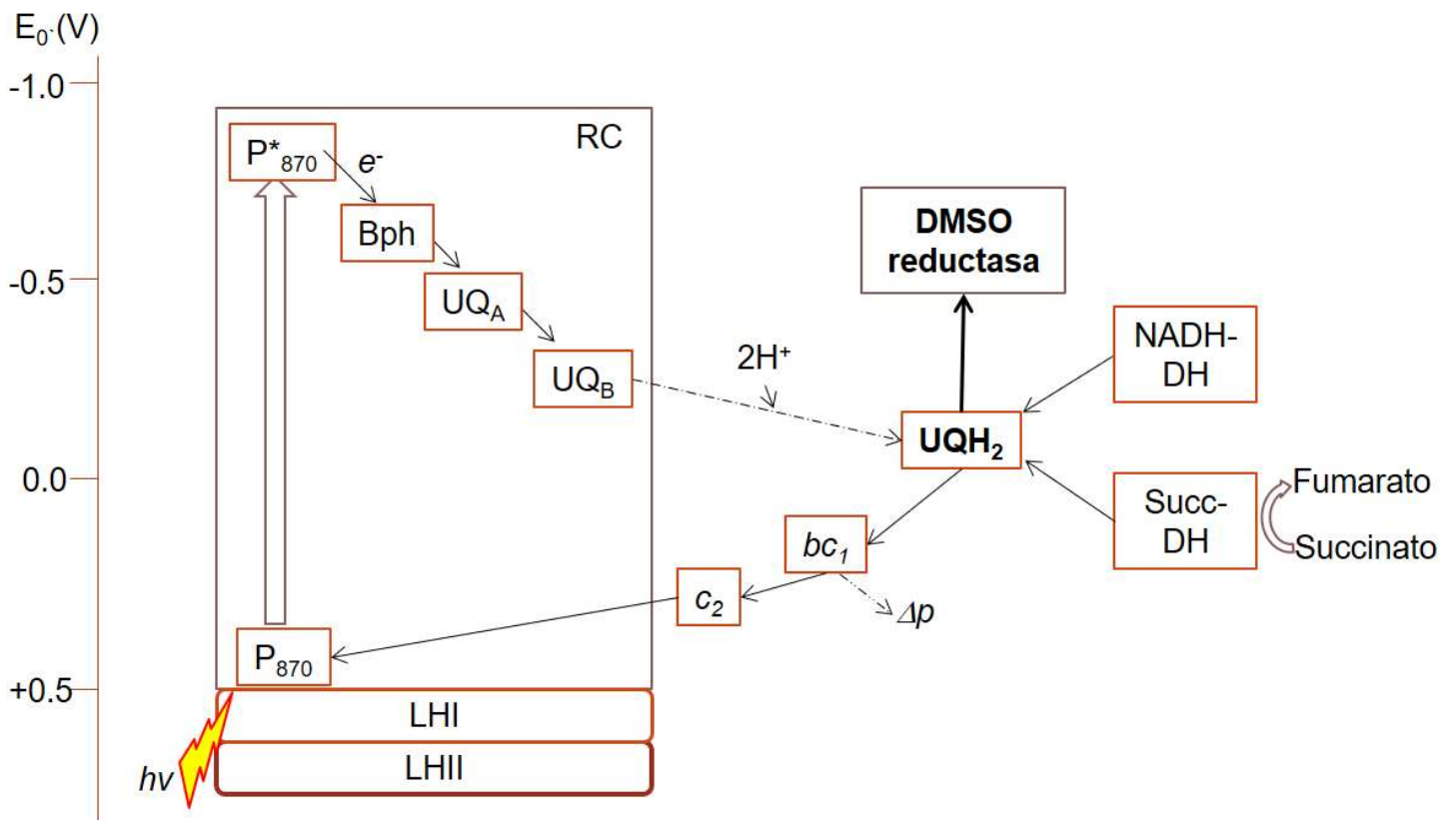


Figura 1. Modelo de la cadena de transporte de electrones de *R. sphaeroides*. En aerobiosis (panel A) durante el metabolismo central del carbono la poza de quinonas es reducida y los electrones son posteriormente transferidos al complejo citocromo bc₁ y de ahí pueden ser transferidos al citocromo C₂ o al citocromo C_y para que finalmente sean transferidos al oxígeno

a través del complejo citocromo c oxidasa tipo cbb_3 o tipo aa_3 . En condiciones anaeróbicas en la luz (panel B) la poza de quinonas es reducida a través del metabolismo central del carbono y por los electrones provenientes del centro de reacción, ahí, los electrones excitados por la luz comienzan una serie de reacciones de óxido reducción de la bacteriofeofitina y las ubiquinonas A y B. Los electrones continúan su flujo de la poza de quinonas al complejo citocromo bc_1 , seguidamente al citocromo C_y , para regresar nuevamente al centro de reacción. En ambos casos también se establece un flujo de protones a través de la membrana necesario para la producción de energía. P_{870} , bacterioclorofila a; P_{870}^* , bacterioclorofila a con electrones excitados; UQH₂, Poza de quinonas reducidas; bc_1 , Complejo citocromo bc_1 ; C_2 , Citocromo soluble C_2 ; C_y , Citocromo C_y unido a membrana; DMSO reductasa, Dimetilsulfóxido reductasa; cbb_3 , Citocromo c oxidasa tipo cbb_3 ; aa_3 , Citocromo c oxidasa tipo aa_3 ; RC, Centro de reacción fotoquímico; Qxt, Quinol oxidasas; LHI y LHII, Complejos cosechadores de luz; Succ-DH, Succinato deshidrogenasa; NADH-DH, NADH deshidrogenasa. Adaptado de Oh y Kaplan (2001) y de Happ y colaboradores (2005).

Metabolismo central del carbono en bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas

A través del metabolismo central del carbono se genera la energía necesaria para la viabilidad celular y se forman los precursores metabólicos para la biosíntesis de los componentes celulares de los organismos quimioheterotróficos (Tang *et al.*, 2011). En organismos fotosintéticos facultativos, las principales rutas catabólicas del carbono son la de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP; glicólisis), la de Entner-Doudoroff (ED) y la vía de fosfogluconato. La activación de estas vías depende de factores ambientales y de la disponibilidad de nutrientes (Imam *et al.*, 2013). Una amplia diversidad de compuestos, como aminoácidos, bases nitrogenadas, lípidos, ácidos grasos, etc., pueden ser usados como fuentes alternativas de carbono y de energía porque el catabolismo de estos produce piruvato, acetil-CoA o intermediarios de las rutas del metabolismo central del carbono que tienen como final común al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA; Moat *et al.*, 2002a).

Después del análisis de la actividad de las enzimas del TCA de *R. sphaeroides*, *Rhodobaca bogoriensis* y *Roseinatronobacter thiooxidans*, Keppen y colaboradores (2013) propusieron que dependiendo de las condiciones de crecimiento de las bacterias fotoheterótrofas anoxigénicas que son capaces de crecer tanto aeróbica como anaeróticamente este ciclo cumple diversas funciones: durante el crecimiento fotoheterotrófico, la principal producción de

ATP es a través de la fosforilación fotosintética y los compuestos oxidados en el TCA son usados como fuente de energía y poder reductor. En cambio, en el crecimiento heterotrófico el ciclo del TCA, además de proveer la fuente de energía y el poder reductor, también juega un papel importante en la bioenergética ya que derivado de él se producen directa o indirectamente un total de 12 moléculas de ATP [3 NADH₂ (=9 ATP), 1 FADH₂ (=2 ATP) y 1 GTP (=1 ATP)], además de intermediarios de otras rutas metabólicas y precursores de la síntesis de aminoácidos (Akram, 2014; Huynen *et al.*, 1999; Uden *et al.*, 2016b).

¿Cómo las bacterias seleccionan la fuente de carbono que consumirán?

El requerimiento de fuentes de carbono y de donadores de electrones difiere dependiendo del tipo de crecimiento de las bacterias. Una característica importante para considerar para que un compuesto pueda ser usado como fuente de carbono y electrones es su potencial de óxido-reducción (o potencial redox), es decir, la capacidad que tiene este compuesto para donar (agente reductor) o para aceptar electrones (agente oxidante). El flujo de electrones va de la molécula de menor potencial redox a una molécula de mayor potencial redox (White *et al.*, 2012a).

El consumo de una fuente de carbono depende de la disponibilidad de esta en el medio, de que en la célula se encuentren receptores y transportadores de estos compuestos y de que las proteínas involucradas en su metabolismo estén sintetizadas. La expresión de muchos de los genes cuyos productos participan en la detección, transporte y metabolismo de las fuentes de carbono puede ser inducida por estos mismos compuestos (Brückner & Titgemeyer, 2002). En general, dentro de una mezcla de fuentes de carbono, las bacterias pueden consumir dos o más compuestos simultáneamente o pueden seleccionar aquella que sea más rápidamente metabolizable y con la que se pueda alcanzar un mayor crecimiento. Cuando se agota la primera fuente de carbono se continúa jerárquicamente con la siguiente fuente de carbono óptima disponible. De seguirse este crecimiento secuencial (o diaúxico) se observará una curva bifásica característica (Görke & Stülke, 2008).

En las bacterias existen diferentes mecanismos para seleccionar una determinada fuente de carbono sobre otras, por ejemplo, el mecanismo regulatorio denominado represión por catabolitos de carbono (CCR) o los circuitos globales de regulación transcripcional que permiten la utilización secuencial de las fuentes de carbono. Además, pueden actuar otros mecanismos, por ejemplo, los RNAs no codificantes pequeños o las proteasas dependientes de ATP y las proteínas chaperonas (Brückner & Titgemeyer, 2002; Gottesman, 2005; Timmermans & Van Melderen, 2010).

Ácidos C4-dicarboxílicos

Los ácidos C4-dicarboxílicos (C4-DCB) son compuestos orgánicos que se caracterizan por poseer en su estructura cuatro átomos de carbono y dos grupos funcionales carboxilo (-COOH; Figura 2). Los más comunes son el ácido succínico, el ácido málico, el ácido fumárico, el ácido oxaloacético y el aminoácido L-aspartato, siendo los cuatro primeros intermediarios en el ciclo del ácido tricarboxílico. Estos compuestos no son fuentes de carbono comunes para la mayoría de las bacterias ya que su potencial redox es cercano a cero (Kleefeld & Uden, 2004; McEwan *et al.*, 1985; Uden *et al.*, 2016b).

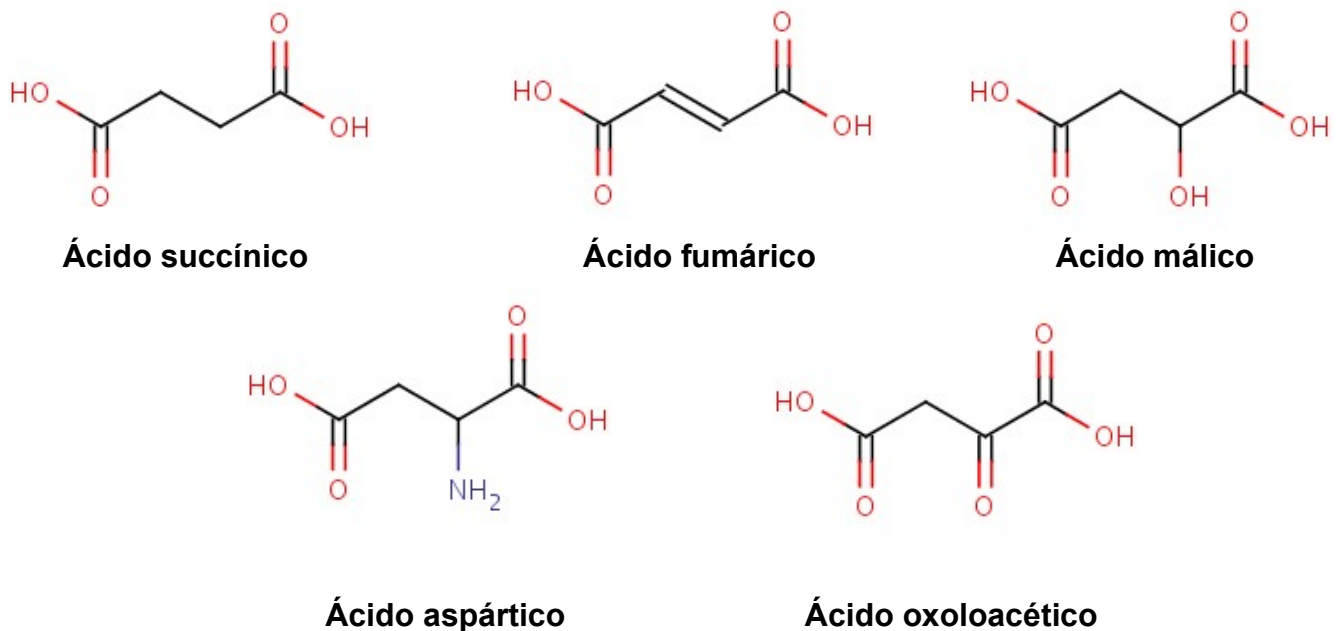


Figura 2. Estructura de algunos ácidos C4-dicarboxílicos importantes para el metabolismo celular (<https://www.ebi.ac.uk/chebi>; Hastings *et al.*, 2016).

Los C4-DCB son abundantes en la materia orgánica ya que son producidos durante la fotólisis de compuestos aromáticos y alifáticos, se producen también como desechos en diversas actividades humanas, además de ser secretados como productos finales en el metabolismo de plantas y bacterias fermentativas. Por ello, constituyen gran parte del carbón orgánico soluble en agua (He *et al.*, 2014; Scheu *et al.*, 2010).

En soluciones acuosas a un pH fisiológico, los ácidos C4-dicarboxílicos se ionizan a aniones llamados C4-dicarboxilatos. En un medio con un $\text{pH} \leq 6$ estos compuestos se encuentran formando monoaniones cíclicos que pueden difundir pasiva y marginalmente a través de las membranas biológicas, por lo tanto, para obtener la cantidad necesaria para el crecimiento celular los organismos requieren de transportadores específicos para estos compuestos (Janausch *et al.*, 2001; Kleefeld & Uden, 2004).

Transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos

Los sistemas transportadores son agrupados en familias de acuerdo con el tipo de ligandos que translocan y a su especificidad. Otro criterio asignado por convención, es que los miembros de una familia de proteínas deben de compartir regiones continuas comparables de al menos 60 aminoácidos (Saier *et al.*, 2016).

En bacterias han sido caracterizadas diez familias de transportadores que pueden translocar C4-DCB, nueve son transportadores activos secundarios que no guardan similitud en sus estructuras primarias, pero se caracterizan por estar conformados por entre 400 y 450 aminoácidos, por poseer entre 10 -13 hélices transmembranales con un perfil hidropático similar y que en al menos una de sus hélices se encuentra un residuo arginina conservado que interactúa con la carga negativa del ligando (Aliverdieva & Mamaev, 2009; Mancusso *et al.*, 2012; Saier, 2000; Valentini *et al.*, 2011). En la última familia, la de transportadores de acetato, el único miembro en el que se ha reportado el transporte de C4-DCB es SatP y es un caso especial porque su mecanismo de transporte está más relacionado con los canales (Sá-Pessoa *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018).

Los miembros de una familia por lo general utilizan el mismo mecanismo de transporte: aquellos transportadores que tienen como función principal el consumo de los C4-DCB lo hacen a través de un mecanismo de simporte, es decir, acoplan el transporte del ligando con el transporte de H⁺ o Na⁺ provenientes de la energía de un gradiente electroquímico de protones o de iones sodio. Otro grupo de transportadores, los del mecanismo antiporte, mueven a los ligandos en direcciones opuestas y su función es la de consumo, intercambio o eflujo (Saier, 2000).

Algunos transportadores de C4-DCB son altamente específicos para el succinato, malato y fumarato, por ejemplo, el sistema DctPQM de *R. capsulatus* (Shaw *et al.*, 1991; Walmsleys *et al.*, 1992). En otro grupo se encuentran los transportadores que son más laxos en cuanto a la especificidad por sus ligandos, por ejemplo, el transportador DctA de *E. coli* donde además de los C4-DCB, pueden ser transportados el glutamato u otros aminoácidos (Janausch *et al.*, 2002). También, dentro de estas familias se pueden encontrar transportadores que no son específicos para los C4-dicarboxilatos, pero los pueden transportar con menor afinidad que a sus verdaderos ligandos. Un ejemplo de ellos es el transportador de citrato YufR de *B. subtilis* que puede transportar al L-malato (Aliverdieva & Mamaev, 2009; Antoine *et al.*, 2005; Uden *et al.*, 2016b). En la tabla 1 se resumen algunas de las características de estos transportadores de C4-DCB.

Tabla 1. Familias de transportadores de C4-DCB en bacterias

Familia / ejemplo de transportador de C4-DCB	Organismos	Mecanismo	# de aa	Hélices transmembranales	Función	K _m	Crecimiento	Ejemplo de sistema regulador
1 CCS (por Citrate: catión symporter) / YufR	Bacterias	Simporte (H ⁺)	441	13	Consumo de L-Mal	n/d	Anaeróbico (pH 5.1- 5.9)	YufLM (<i>Bacillus subtilis</i> ^A)
2 DASS (por Divalent anion: Na symporter) / TtdT	Arqueas Bacterias Eucarias	Antiporte Tart: Suc	487	11	Eflujo	400 μM (Suc)	Anaeróbico	YgiP (<i>E. coli</i> ^B)
3 DAACS (por Dicarboxylate/ amino acid catión Na ⁺ or H ⁺ symporter) / DctA	Arqueas Bacterias Eucarias	Simporte	450	8 + 2 regiones re-entrantes	Consumo	10- 30 μM	Aeróbico	DctBD (<i>Sinorizobium meliloti</i> ^{C, D})

Tabla 1. Continuación...

Familia / ejemplo de transportador de C4-DCB	Organismos	Mecanismo	# de aa	Hélices transmembranales	Función	K _m	Crecimiento	Ejemplo de sistema regulador
4 Dcu (por C4-dicarboxylate uptake)/ DcuA , DcuB	Bacterias	Antiporte	434-446	11 a 12	Eflujo Consumo	50 a 100 μM	Anaeróbico o anaeróbico facultativo	DcuSR (DcuB de <i>E. coli</i> ^F)
5 DcuC (por C4-dicarboxylate uptake DcuC)	Bacterias entéricas	Simporte* (H ⁺) Antiporte Fum: Suc	461	12	Eflujo Consumo	n/d	Anaeróbico	FNR (<i>E. coli</i> ^F)
6 SulP (por Sulphate permease) / DauA	<i>E. coli</i>	Simporte	559	10	Consumo	0.56 mM	Aeróbico (pH ácido)	n/d
7 CitMHS (por Citrate-Mg ²⁺ :H ⁺ - citrate: H ⁺ symporter) / CitT	Bacterias Eucarias	Antiporte Cit: Suc Tar: Suc	487	12	Eflujo Consumo	n/d	Anaeróbico	CitAB (<i>E. coli</i> ^G)
8 AceTr (por Acetate uptake transporter) / SatP	Bacterias Eucarias	*Canal Suc-Ace	188	6	Consumo	1.18±0.10 mM (Suc)	Aeróbico pH 6	n/d
9 TTT (por Tripartite Tricarboxylate Transporters) / MatCBA	α y β-proteobacterias	Simporte (H ⁺)	C 335 B 203 A 442	C-periplásmica B- 4 A-12	Consumo	21 nM (Fum) 27 nM (Suc)	Anaeróbico	n/d
10 TRAP (por Tripartite ATP-Independent Periplasmic transporters) / DctPQM	Arqueas Bacterias	Simporte (H ⁺ o Na ⁺)	P 335 Q 203 M 442	P-periplásmica Q- 4 M-12	Consumo	50 μM (Suc) 250 μM (Fum) 6.3 μM (Mal)	Aeróbico y anaeróbico	DctSR (<i>R. capsulatus</i> ^H) DctBD (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^I)

(Antoine *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2015; Golby *et al.*, 1999; ^HHamblin *et al.*, 1993; Janausch *et al.*, 2002; Karinou *et al.*, 2013, 2017; ^BKim & Uden, 2007; Krom *et al.*, 2000, 2003; Mancusso *et al.*, 2012; Mulligan *et al.*, 2011; Oshima & Biville, 2006; Rosa *et al.*, 2018, 2019; Sá-Pessoa *et al.*, 2013; ^DScheu *et al.*, 2010, 2012^G; Sun *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019; Six *et al.*, 1994; ^ATanaka *et al.*, 2003; Uden *et al.*, 2016b; ^IValentini *et al.*, 2011; Västermark & Saier, 2014; ^CZhou *et al.*, 2008; Zientz *et al.*, ^E1998, ^F1999;).

* Las evidencias sugieren que es un canal formado de 6 homohexámeros, pero aún no está claro el mecanismo de transporte (Sun *et al.*, 2018).

n/d no determinado; Tar- tartrato; Suc- succinato; Fum- fumarato; Mal- malato- Ace- acetato; Cit- citrato

En la mayoría de las bacterias cuyo genoma está secuenciado, se ha encontrado al menos un transportador de C4-DCB. En el genoma de *E. coli*, por ejemplo, se han encontrado codificados 9 sistemas transportadores diferentes (DctA, DauA, SatP, DcuA, DcuB, DcuC,

TtdT, DctPQM, CitT y SatP), aunque no todos han mostrado ser funcionales (Janausch *et al.*, 2002; Sá-Pessoa *et al.*, 2013; Golby, *et al.*, 1999). En aerobiosis y en un pH neutro, el sistema DctA es el principal transportador de C4-DCB. En un medio con valores de pH cercanos a 5, *E. coli* utiliza al transportador DauA para el consumo de los ácidos succínico y fumárico (Unden *et al.*, 2016a; 2016b). También se puede encontrar al transportador DcuA que se expresa constitutivamente, aunque su principal función se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas (Strecker *et al.*, 2018). Las mutantes en estos transportadores presentan crecimiento residual en ácido succínico debido a que la proteína homohexámerica SatP (por Succinate–Acetate Transporter Protein) puede translocar al acetato y con menor afinidad al ácido succínico cuando el pH del medio está cercano a 6 (Sá-Pessoa *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018).

Durante el crecimiento anaeróbico de *E. coli*, los transportadores DcuA, DcuB, DcuC, TtdT y CitT son funcionales (Janausch *et al.*, 2002; Pos *et al.*, 1998). Tanto DcuA como DcuB transportan al interior celular al L-malato, aspartato o fumarato para ser metabolizados a través de un ciclo TCA incompleto (Moat *et al.*, 2002b; Unden *et al.*, 2016b). DcuC puede mediar el intercambio y consumo de los C4-DCB, aunque su función principal es la del eflujo del succinato que se produce en el metabolismo fermentativo de las hexosas (Kleefeld & Unden, 2004; Lukas *et al.*, 2010; Unden *et al.*, 2016b). Durante la fermentación del L-tartrato, el transportador TtdT acopla el transporte de L-tartrato al citoplasma con el eflujo del succinato (Kim & Unden, 2007). CitT, por su parte es un antiporter citrato: succinato que funciona principalmente en anoxia y solo bajo ciertas circunstancias es funcional en presencia de oxígeno (Pos *et al.*, 1998). En todos los casos, el succinato es expulsado de la célula por estos transportadores como producto final del metabolismo anaeróbico (Figura 3).

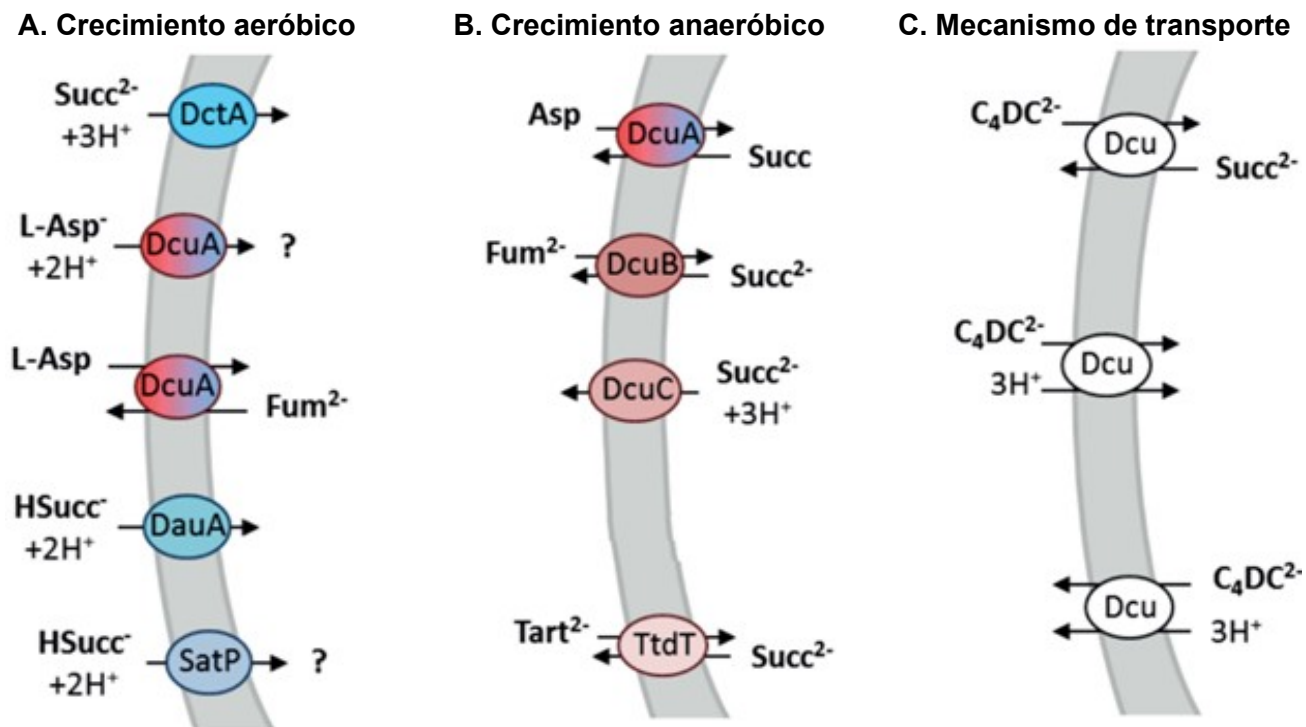


Figura 3. Transportadores de C4-DCB en *E. coli* durante el crecimiento aeróbico (A) y anaeróbico (B). Se indican también los diferentes mecanismos de translocación de los metabolitos (C), el superior es antiporte y los dos inferiores simporte. Modificada de Unden *et al.*, 2016b.

Familia de transportadores periplásmicos tripartitas independientes de ATP

La familia TRAP (Familia de transportadores periplásmicos tripartitas independientes de ATP), pertenece a un grupo de 3 familias de transportadores donde también se encuentran los transportadores activos tipo ABC y los sistemas transportadores tripartitas de ácidos tricarbónicos (TTT). Estos tres tipos de transportadores tienen en común la presencia de una proteína periplásmica que une con alta afinidad a su ligando (SBP; Substrate Binding Protein), además se ha propuesto que esta proteína brinda direccionalidad al transporte. En organismos Gram negativos la SBP se encuentra soluble en el periplasma y en los organismos Gram-positivos es una proteína anclada a la membrana plasmática (Berntsson *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2007; 2011; Rabus *et al.*, 1999).

Además de la SBP o subunidad P, los transportadores tipo TRAP están formados por dos proteínas integrales de membrana: la más grande conocida como subunidad M, de 12 hélices transmembranales, es una permeasa de la superfamilia de transportadores de iones que tienen en común la presencia de dos pares de residuos prolina conservados, uno entre las hélices IV y el otro en la hélice XI formando el canal de translocación (Prakash *et al.*, 2003; Rabus *et al.*, 1999). La segunda proteína integral de membrana es conocida como subunidad Q, consta de 4 hélices transmembranales, son proteínas con poca identidad en su secuencia y solo se han encontrado asociadas a sistemas transportadores tipo TRAP. La función de esta subunidad pequeña aún no está clara, pero se ha propuesto que puede estar relacionada con la estabilización de la permeasa (subunidad M), o que puede funcionar como interfaz entre la SBP y la subunidad M, e incluso que puede funcionar como un acoplante entre la energía generada por el flujo de iones/protones y el transporte del ligando. En algunos sistemas estas subunidades membranales pueden estar fusionadas al conectarse por una hélice transmembranal adicional (Fischer *et al.*, 2015; Rabus *et al.*, 1999; Wyborn *et al.*, 2001; Forward, *et al.*, 1997; Kelly & Thomas, 2001).

Los sistemas tipo TRAP solo se han encontrado en bacterias y arqueas, principalmente en aquellas que viven en ambientes marinos y en medios con baja concentración de nutrientes (Kelly & Thomas, 2001; Mulligan *et al.*, 2007, 2011). Se ha reportado que hay sistemas TRAP específicos para una amplia diversidad de solutos, la mayoría de ellos con al menos un grupo carboxilo en su estructura, por ejemplo, piruvato, 2-oxobutirato (Pernil *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2006), ácido siálico (Allen *et al.*, 2005; Severi *et al.*, 2005), ectoína (Grammann *et al.*, 2002), glutamato (Quintero *et al.*, 2001), ácido N- Acetilmurámico (Fischer *et al.*, 2010; Mulligan *et al.*, 2007; Rabus *et al.*, 1999) o algunos cuantos solutos, como la taurina, que carecen de un grupo carboxilo pero tienen grupo sulfonato (Brüggemann *et al.*, 2004).

Mecanismo de transporte en sistemas tipo TRAP

Basados en los datos de cristalografía y estudios fisiológicos de los transportadores tipo TRAP y de otros transportadores secundarios caracterizados, se ha propuesto un mecanismo general de translocación de ligandos de estos sistemas transportadores, donde: en el periplasma la subunidad SBP une al ligando con alta afinidad a través de un puente salino formado entre la carga negativa del ligando y un residuo arginina conservado en la proteína que generalmente está como dímero y adopta una conformación cerrada. Con esta forma estructural, la SBP acerca al ligando a las proteínas de membrana interna, que reconocen esta conformación y posiblemente utilizan a los iones H^+ o Na^+ para abrir a la proteína periplásmica liberando al ligando cerca de la permeasa y estimulando a que esta subunidad adopte una conformación con la que se permite el paso del ligando al interior celular. Con la separación del ligando de la proteína periplásmica, esta queda libre para seguir uniéndose a más ligando (Figura 4) (Akiyama *et al.*, 2009; Cuneo *et al.*, 2008; Gonin *et al.*, 2007; Kuhlmann *et al.*, 2008; Marinelli *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2011; Prakash *et al.*, 2003).

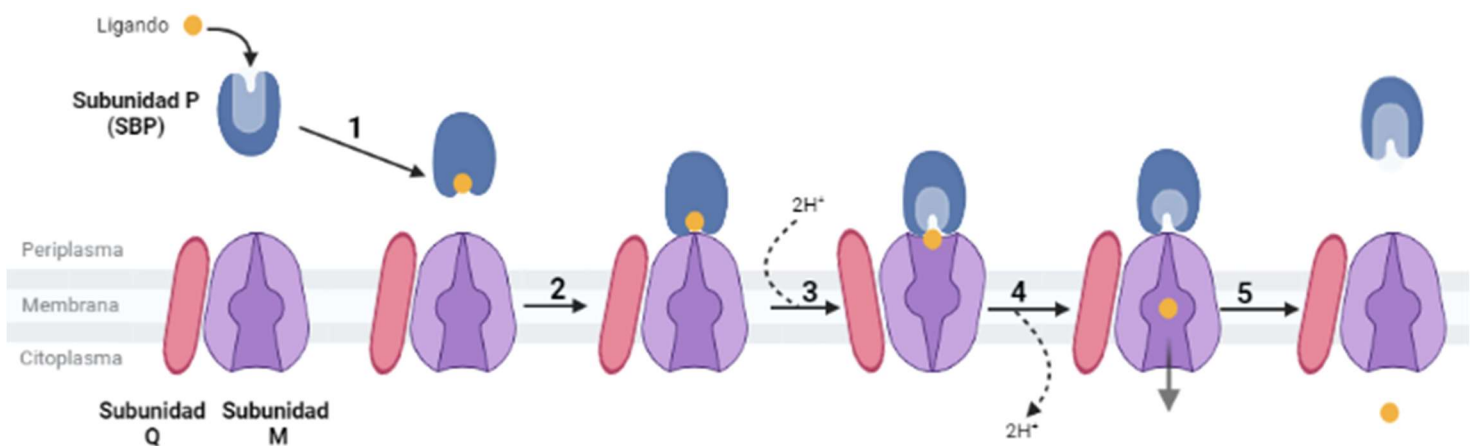


Figura 4. Esquema del mecanismo de transporte de los sistemas transportadores tipo TRAP basado en el mecanismo hipotético propuesto por Mulligan y colaboradores (2011), donde la proteína periplásmica SBP (subunidad P) une el metabolito a ser transportado [1], lo acerca a las proteínas integrales de membrana [2]; los iones H^+ o Na^+ promueven la liberación de la SBP [3] y el transporte del ligando a través de la permeasa (subunidad M) [4], para que finalmente la SBP se libere en una conformación abierta y la permeasa regrese a su conformación inicial [5].

Sistemas de dos componentes

La estructura básica de un sistema de dos componentes consiste en una proteína cinasa de histidina (HK) y una segunda proteína denominada regulador de respuesta (RR), estas proteínas interactúan con una alta afinidad lo que determina su especificidad, salvo algunas pocas excepciones donde se establecen redes de regulación cruzadas entre pares de cinasas de histidina y reguladores de respuesta parálogos (Huynh *et al.*, 2015; Laub & Goulian, 2007; Podgornaia & Laub, 2013; Willett *et al.*, 2013). La función principal de este conjunto de proteínas es la de conectar la detección de una señal celular y/o ambiental con una respuesta celular apropiada (Laub & Goulian, 2007; Mascher *et al.*, 2006; Skerker *et al.*, 2008; Stock *et al.*, 2000).

Una vez que la señal es detectada, la comunicación entre la HK y el RR ocurre a través de la transferencia del grupo fosforilo (Pi) del ATP. Durante la transducción de señales ocurren tres reacciones químicas principales (Barbieri & Stock, 2008; McCleary & Stock, 1994; Stock *et al.*, 2000; Stock *et al.*, 1989):

- a) La **autofosforilación**: como consecuencia de la percepción de la señal por el dominio sensor de la HK, una molécula de ATP es hidrolizada en el dominio catalítico (CA o dominio de unión a ATP). El grupo Pi es conducido a un residuo histidina conservado en el dominio de dimerización (DHP; dimerization and histidine phosphotransfer), llevándola a un estado activo (Figura 5a). Muchas HK se encuentran en la membrana como homodímeros en los que la autofosforilación puede darse en *cis* o en *trans* (Attwood, 2013).
- b) Después ocurre una reacción de **fosfotransferencia**, donde el RR cataliza la transferencia del Pi desde la HK hasta un residuo aspártico conservado en el dominio receptor (REC) ubicado en el extremo N-terminal del RR (Figura 5b). Cuando el regulador de respuesta es un factor transcripcional, la fosforilación de la proteína puede provocar la dimerización del RR lo que lleva a que sus dominios de unión a DNA (DBD), ubicados en el extremo C-terminal, incrementen su afinidad por una secuencia específica del DNA blanco que pueden ser secuencias con simetría diada o secuencias palindrómicas en las regiones promotoras de los genes regulados por el RR (Dufour *et al.*, 2010), aunque la fosforilación no siempre lleva a la activación del RR (Desai & Kenney, 2016; Galperin, 2006);

c) por último, ocurre la **desfosforilación**, la cual es una reacción que se lleva a cabo por el ataque nucleofílico de una molécula de agua en el grupo Pi que está en el residuo aspártico conservado del regulador de respuesta (Stock *et al.*, 2000). Esta hidrólisis muchas veces es catalizada por la misma HK o por otras fosfatasas y es un elemento importante en la transducción de la señal porque lleva a que esta respuesta sea efectiva, específica y adecuada (Mascher *et al.*, 2006; Stock *et al.*, 2000).

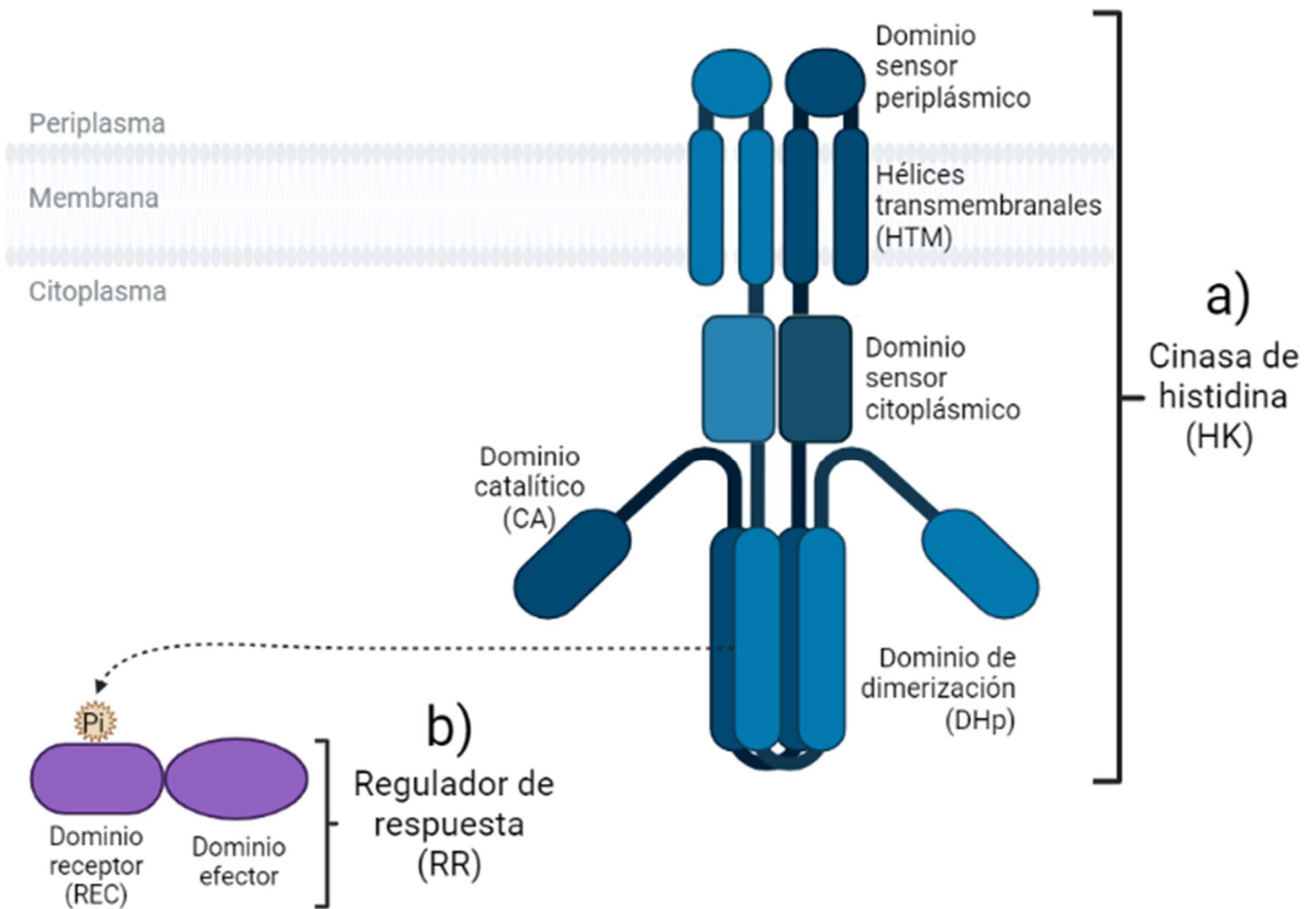


Figura 5. Modelo de un sistema de dos componentes ortodoxo. En a) se muestra al homodímero de la cinasa de histidina (HK) membranal con sus hélices transmembranales (HTM), los dominios catalíticos (CA) y de dimerización (DHP). Además, la HK puede tener dominios sensores periplásmicos y/o citoplásmicos. En b) se muestra al monómero del regulador de respuesta (RR) con su dominio receptor (REC) y su dominio efector. Con la flecha discontinua se representa la transferencia del grupo fosforilo (Pi) del dominio DHP de la HK al dominio REC del RR. Basado en Zschiedrich y colaboradores, 2016.

Dominios sensores de las cinasas de histidina

Además de sus dominios catalíticos y de dimerización, las cinasas de histidina pueden tener dominios sensores asociados. Hasta la fecha se han descrito cerca de 20 dominios relacionados con la percepción de señales extracitoplásmicas y citoplásmicas. Las señales percibidas por estos dominios pueden ser desde pequeños péptidos y aminoácidos (como los detectados por el dominio CHASE-CHASE6), nucleótidos cíclicos (como los detectados por el dominio GAF), señales celulares como la presión de turgencia detectada por un dominio encontrado en cinasas osmosensitivas tipo KdpD o señales ambientales como la presencia de luz y de oxígeno (detectadas por el dominio PAS), entre otros. Aunque también, existe un buen número de dominios sensores para los cuales aún no se han identificado las señales que reconocen (Galperin *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2009; Mascher *et al.*, 2006; Schäper *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2012; Walderhaug *et al.*, 1992).

Los dominios sensores PAS (por las proteínas Per-ARNT-Sim donde fueron por primera vez reconocidos) están ampliamente representados en las cinasas de histidina. Sus secuencias primarias, de entre 100 y 120 residuos, tienen bajo porcentaje de identidad y similitud, pero su plegamiento está más conservado, particularmente la estructura de 5 hojas beta antiparalelas y 4 hélices alfa. La variedad de grupos prostéticos (flavina, hemo o ácido para-coumárico) asociados a estos dominios y los residuos que rodean a estos grupos, están relacionados con la detección de una amplia variedad de señales como el estado redox, los niveles de energía, la luz, los pequeños ligandos, el oxígeno, etc. (Aono, 2013; Pandini & Bonati, 2005; Taylor, 1999).

Sistemas de dos componentes que regulan la expresión de los transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos

Se han identificado varios sistemas de dos componentes que se encargan de detectar la presencia de C4-DCB en el medio y en respuesta controlan la expresión de genes cuyos productos son las proteínas transportadoras (ver tabla 1) y en algunos casos, las proteínas involucradas en el metabolismo de estos compuestos u otros procesos celulares (Asai *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2014; Mascher *et al.*, 2006; Scheu *et al.*, 2010; Unden *et al.*, 2016a). Por

ejemplo, el sistema DcuSR de *E. coli* que en presencia de C4-DCB en el medio, además de regular la expresión de los genes *dctB*, *dctA* que codifican para sistemas transportadores de C4-DCB, también regula la expresión del operón *frdABCD* cuyo producto es el complejo que forma la enzima fumarato reductasa (Golby *et al.*, 1999; Jones & Gunsalus, 1987). Otro ejemplo es el sistema DctBD de *Vibrio vulnificus* que está relacionado con la activación de la transcripción de *dctA* inducida por los C4-DCB. Además, regula la expresión de algunos de los genes relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos necesarios para la formación de biopelículas (Kang *et al.*, 2021).

Aunque presentan bajo porcentaje de identidad en sus secuencias (entre el 19 y 25 %), las cinasas de histidina DctB, CitA y DcuS relacionadas con la detección de los C4-DCB, tienen en común la presencia de al menos un dominio PAS en su región periplásmica. En DctB, la región entre las dos hélices transmembranales está formada por aproximadamente 280 residuos donde se reconocen dos dominios PAS denominados PASp distal (cerca del N-terminal) y PASp proximal (Zhou *et al.*, 2008). La interacción directa de los C4-DCB con el dominio PASp distal lleva a que esta cinasa de histidina se autofosforile en *trans* (Giblin *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2008). Por su parte, los dominios periplásmicos de CitA y de DcuS son de aproximadamente 140 residuos, con un dominio PAS conservado al cual se unen directamente los C4-DCB, aunque también pueden unir a otros ligandos como ácidos C6-dicarboxílicos o citrato, por lo que estas cinasas son menos específicas que DctB (Kneuper *et al.*, 2005; Krämer *et al.*, 2007; Scheu *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2008).

Sistemas transportadores de C4-DCB que participan en la transducción de señales

Algunas proteínas de sistemas transportadores, además de cumplir con su función primaria en la translocación de sus ligandos a través de la membrana, también forman parte de la vía de señalización al funcionar como co-sensores de la concentración extracelular o intracelular del ligando o al modular la activación de las cinasas de histidina, proveyendo de información a los sistemas reguladores sobre el flujo del ligando a través del mismo transportador (Antoine *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2014; Piepenbreier *et al.*, 2017; Scheu *et al.*, 2010; Uden *et al.*, 2016a).

En el sistema de dos componentes DcuSR de *E. coli*, los homodímeros de la cinasa de histidina DcuS, en ausencia de su inductor, se encuentran unidos por sus dominios PAS citoplásmicos y de esta forma son incapaces de autofosforilarse. Esta estructura silenciada (estado OFF) es estabilizada por una alfa hélice anfipática de 50 residuos ubicada en el extremo C-terminal del transportador DctA (condiciones aeróbicas;) o el transportador DcuB (en condiciones anaeróbicas) (Figura 6 A). En presencia de los C4-DCB, estos compuestos se unen directamente al dominio PAS periplásmico de DcuS, provocando un cambio conformacional con el que se libera la asociación de los dominios PAS citoplásmicos, al tiempo que el transportador activo DctA también cambia su conformación retirando la hélice anfipática del C-terminal permitiendo la autofosforilación de la cinasa (estado ON; Figura 6 B) (Davies *et al.*, 1999; Monzel & Uden, 2015; Scheu *et al.*, 2014; Uden *et al.*, 2016a; Witan *et al.*, 2012). El papel del transportador DctA en el silenciamiento de una cinasa de histidina también ha sido reconocido en las bacterias fijadoras de nitrógeno *R. leguminosarum* y *S. meliloti*, donde en ausencia de C4-DCB, DctA favorece la inhibición de la autofosforilación de la HK del sistema de dos componentes DctBD (Golby *et al.*, 1999; Jording *et al.*, 1993; Yarosh *et al.*, 1989).

Bacillus subtilis integra la información sobre la presencia de C4-DCB en el medio formando el complejo sensor tripartita DctB-DctS-DctA, donde, la cinasa de histidina del sistema de dos componentes DctSR (o YdbFG) detecta indirectamente la presencia de estos compuestos cuando están unidos a la proteína de unión a ligando DctB (también conocida como YdbE). DctB comparte un 37 % de identidad con DctP de *R. capsulatus*, pero diferencia de esta, DctB no está asociada a subunidades membranales de algún sistema transportador. En ausencia de C4-DCB, DctA (o YdbH) estabiliza el silenciamiento de la cinasa DctS (Figura 6 C) de forma parecida a la que el homólogo de DctA lo hace con DcuS en *E. coli* (Asai *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2014; Kleefeld *et al.*, 2009).

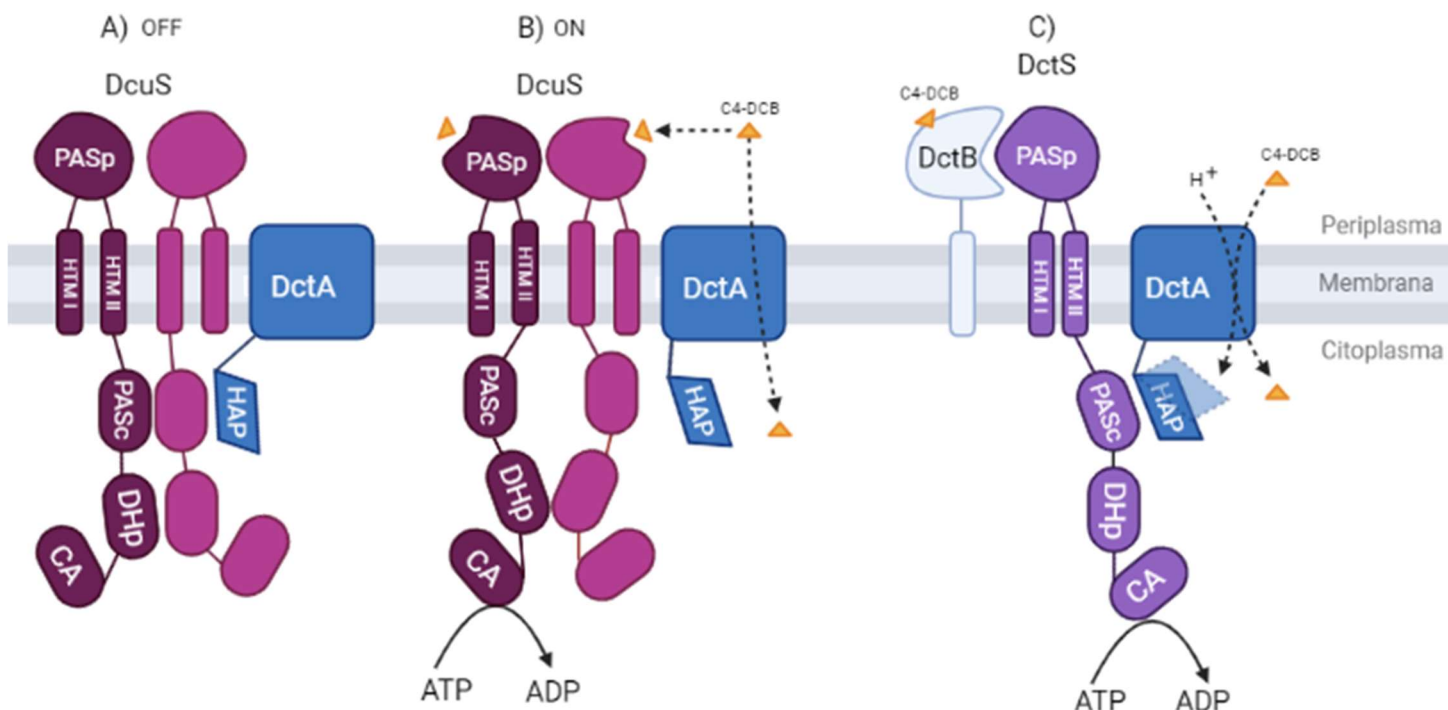


Figura 6. Modelos de participación de sistemas transportadores de C4-DCB en la traducción de señales. En A) se muestra el modelo de la interacción de la HK DcuS con la proteína transportadora DctA. En ausencia de C4-DCB el dímero de DcuS se mantiene silenciado (OFF) a través de la unión del dominio Per-ARNT-Sim citoplásmico (PAS_c) de cada subunidad, esta estructura es estabilizada por la hélice anfipática (HAP) del extremo C-terminal de DctA. En el estado ON, cuando los C4-DCB están presentes estos se unen directamente al dominio Per-ARNT-Sim periplásmico (PAS_p) de la cinasa DcuS, lo que provoca el movimiento de la hélice transmembranal II (HTM II) y la separación de los dominios PAS_c, permitiendo la autofosforilación (ON) (Modificado de Uden *et al.*, 2016A). En C) se muestra el modelo del complejo sensor de C4-DCB formado por la proteína de unión a ligando DctB que une a los C4-DCB e interacciona con el dominio PAS_p de la HK DctS y de esta forma los dominios PAS_c se liberan del silenciamiento estabilizado por la HAP de DctA (Modificado de Graf *et al.*, 2014).

Antecedentes

Rhodobacter sphaeroides

*Rhodobacter sphaeroides** es una alfaproteobacteria del clado de las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas que pertenece a la familia *Rhodobacteraceae*. Se distribuye principalmente en las partes anóxicas expuestas a la luz de cuerpos de agua con alto contenido de materia orgánica (Imhoff *et al.*, 1984).

* Nombre actual: *Cereibacter sphaeroides* (van Niel 1944) Hördt *et al.*, 2020
Sinónimo homotípico: *Luteovulum sphaeroides* (van Niel 1944) Suresh *et al.*, 2019
Rhodobacter sphaeroides (van Niel, 1944) Imhoff *et al.*, 1984
Basiónimo: *Rhodopseudomonas sphaeroides* van Niel 1944

En esta bacteria, los pigmentos fotosintéticos responsables del perfil de absorción característico de las células vivas (con máximos a 372-375, 446-450, 474-481, 507-513, 588-590, 800-805, 850-852 y 870-880 nm) son la bacterioclorofila a y los carotenoides de la serie de la esferoidenona. Durante el crecimiento fototrófico, estos pigmentos están contenidos en los cromatóforos (Figura 7 A; Imhoff, 2015), que además alojan al resto de los componentes del aparato fotosintético que son sintetizados en presencia de luz y cuando la tensión de oxígeno está aproximadamente en el 2.5 % (Kiley & Kaplan, 1988). Mientras que en el crecimiento heterotrófico la membrana no muestra invaginaciones (Figura 7 B).

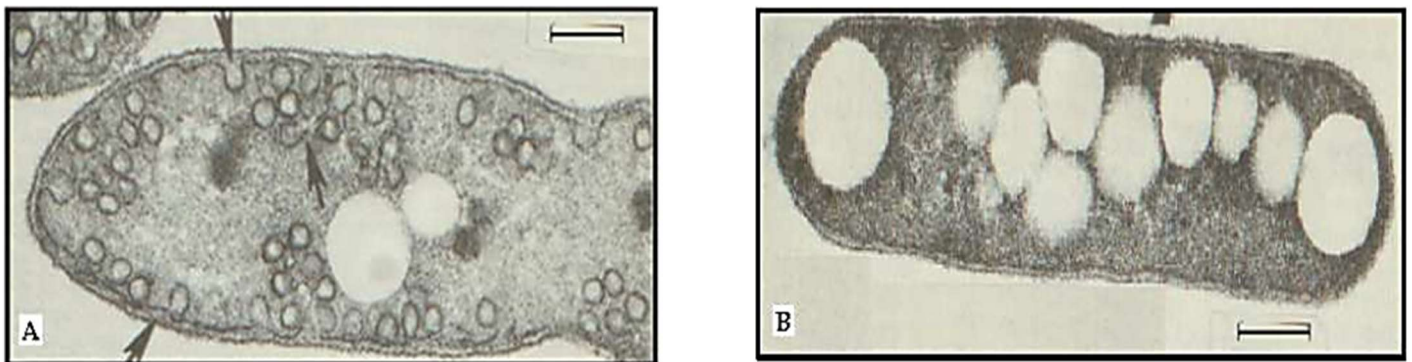


Figura 7. Fotografías de microscopía electrónica que muestran la diferenciación de la membrana interna de *R. sphaeroides* en las diferentes condiciones de crecimiento. A) en condiciones anaeróbicas y en presencia de luz se desarrollan invaginaciones de membrana en forma de vesículas (señaladas por una flecha), donde, además del aparato fotosintético, se alojan los componentes de la cadena de transporte de electrones, sistemas transportadores, sistemas de dos componentes, etc. B) durante el crecimiento heterotrófico se observa la membrana continua y la acumulación de gránulos de reserva de polihidroxi butirato (PHB). La barra corresponde a 0.2 μm (Fotos tomadas de Remsen, 1972).

El genoma de *R. sphaeroides* WS8, de aproximadamente 4.5 Mpb, está agrupado en dos cromosomas (Chl I de 3.14 kpb y el Chl II de 0.97 kpb), el plásmido A de 200 kpb y el plásmido B de 100 kpb. Una de sus peculiaridades es que presenta múltiples copias de ciertos genes que pueden estar o no en el mismo cromosoma, por ejemplo, los genes de tRNA, los genes flagelares o los genes de algunos sistemas transportadores (Mackenzie *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2012; Poggio *et al.*, 2007).

Este organismo es móvil por la presencia de dos sistemas flagelares con distinto origen evolutivo que se sintetizan en diferentes fondos génicos y condiciones de crecimiento (Poggio *et al.*, 2005). La expresión de los genes que codifican para el flagelo 2 (sistema de herencia vertical) es reprimida en presencia de C4-DCB (Del Campo *et al.*, 2007; Vega-Baray *et al.*, 2015). La fuente de carbono determina también el tamaño celular, pues cuando crecen usando algún sacárido las células pueden estar entre 2.0- 2.5 x 2.5-3.5 μm , mientras que con una fuente de carbono distinta las células están en un rango de entre los 0.7- 4.0 μm (Imhoff *et al.*, 1984; Imhoff, 2015).

Metabolismo central del carbono en *R. sphaeroides*

R. sphaeroides se adapta fisiológicamente a los cambios ambientales en la concentración de oxígeno, la cantidad de luz y la disponibilidad de nutrientes al utilizar las diferentes rutas metabólicas que es capaz de llevar a cabo, principalmente: el ciclo Calvin-Benson-Bassham (CBB), la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la vía Entner-Doudoroff (ED), la vía pentosa-fosfato (PPP) y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) (Arai *et al.*, 2008; 2013; Tao *et al.*, 2012; Figura 8).

Con el propósito de probar las capacidades metabólicas de esta bacteria, Imam y colaboradores (2013) usaron microarreglos fenotípicos para mostrar que esta especie crece en una diversa gama de sustratos (76 diferentes fuentes de carbono, 66 de nitrógeno, 42 de fósforo y 18 de sulfuro). En este trabajo también proponen que el perfil de utilización de estos compuestos varía significativamente entre condiciones de crecimiento fotosintéticas y no fotosintéticas.

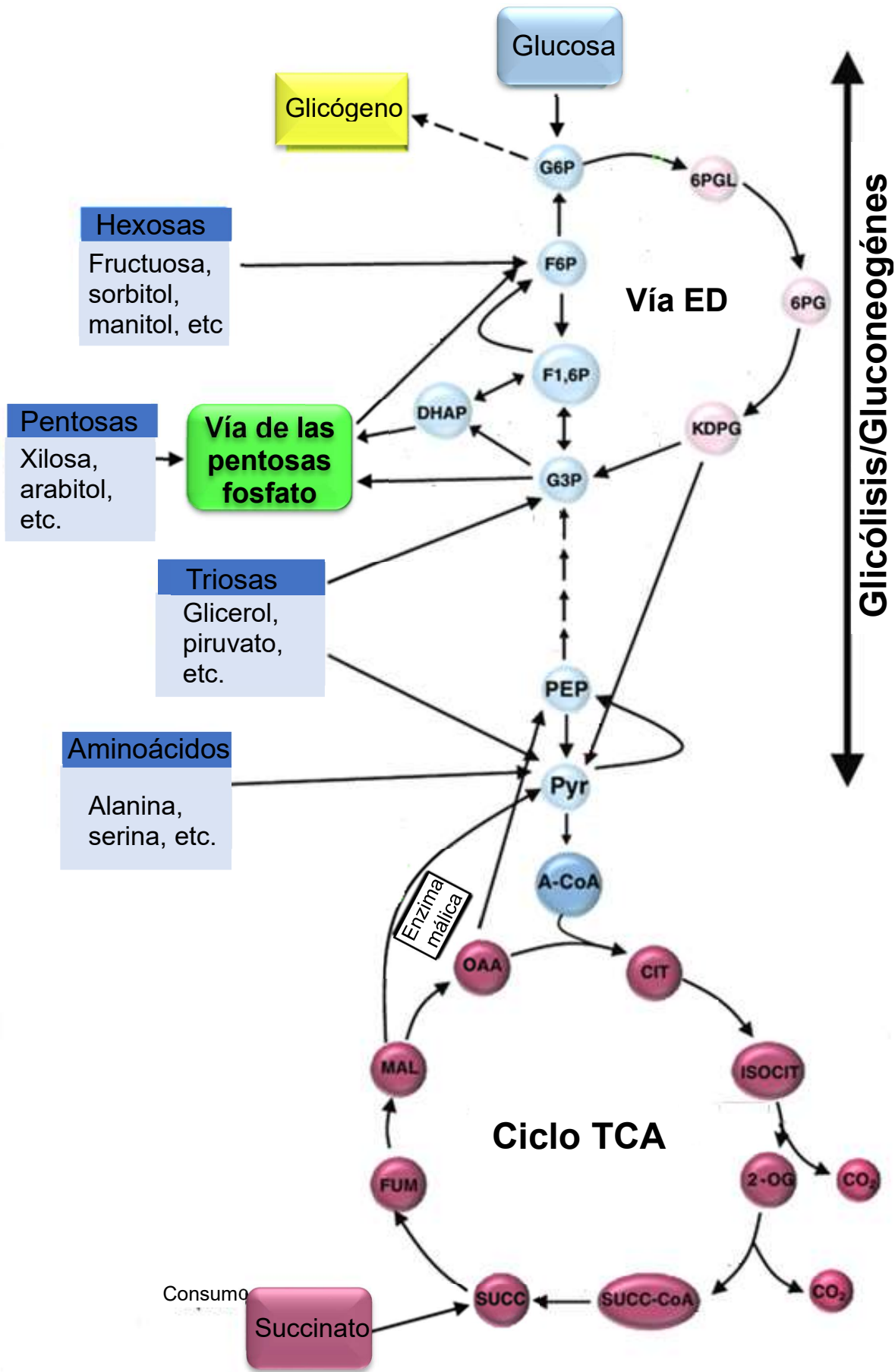


Figura 8. Metabolismo central del carbono en *R. sphaeroides*. G6P, glucosa 6 fosfato; F6F, fructosa 6-fosfato; F1,6P, fructosa-1,6-bisfosfato; G3P, glucosa 3 fosfato; PEP, fosfo enolpiruvato; Pyr, piruvato; A-CoA, acetil CoA; Cit, citrato; ISOCIT, isocitrato; 2-OG, 2-oxoglutarato; SUCC-CoA, succinil CoA; SUCC, succinato; FUM, fumarato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; KDPG, 2-dehidro-3-deoxi-D-gluconato 6-fosfato; vía Ed, vía Entner-Doudoroff; TCA, ácidos tricarboxílicos. Modificado de Imam y colaboradores (2013).

Un indicio del requerimiento diferencial de los compuestos de carbono durante el crecimiento de *R. sphaeroides* se observa al comparar la actividad de algunas de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs, particularmente aquellas relacionadas directamente con el metabolismo de los C4-DCB, porque durante el crecimiento heterotrófico la actividad de estas enzimas es entre 3 y 8 veces superior que en crecimiento fotoheterotrófico (Tabla 2). (Grammel *et al.*, 2003; Keppen *et al.*, 2013).

Tabla 2. Actividad* de las enzimas del ciclo TCA en *R. sphaeroides*

Enzima	Condiciones de crecimiento	
	Aeróbico en la oscuridad	Anaeróbico en la luz
Aconitasa	388.3	217.1
Isocitrato dehidrogenasa	429.3	100.6
Succinato dehidrogenasa	73.2	18.9
Fumarato hidratasa	1345.2	165.0
Malato deshidrogenasa	1600.1	517.1

*nmol/min por mg proteína; Keppen *et al.*, 2013

De acuerdo con Imam y colaboradores (2015) los factores transcripcionales CceR (por central carbon and energy metabolism regulator; RSP1663) y AkgR (por alpha-ketoglutarate regulator; RSP_0981) están relacionados con el control de la expresión de los genes del metabolismo central del carbono en *R. sphaeroides*. El papel principal de estos reguladores se expresa bajo condiciones de crecimiento fotosintético con succinato como principal fuente de carbono. A través de un análisis transcripcional de la mutante $\Delta cceR$ se observó una expresión diferencial de 54 genes que están directamente relacionados con el transporte o la utilización de las fuentes de carbono, el transporte de electrones y el metabolismo energético

y 31 de éstos codifican para proteínas del metabolismo central del carbono. En la mutante *ΔakgR* no se observa ningún efecto sobre el crecimiento fotosintético ni heterotrófico con succinato como fuente de carbono, pero sí se afecta su crecimiento con piruvato, propionato, α-cetoglutarato y acetato.

Ácidos C4-DCB en el metabolismo de *R. sphaeroides*

Los C4-DCB succinato, malato y fumarato, son adicionados comúnmente como fuentes de carbono en los medios de cultivo de *R. sphaeroides* porque son sustratos que permiten todos sus tipos de crecimiento, son incorporados directamente al metabolismo a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por lo cual son rápidamente metabolizados y su consumo lleva a un marcado incremento (3 veces) del crecimiento celular de esta bacteria en comparación de cuando se utilizan compuestos de 6 carbonos (Keppen *et al.*, 2013).

En el estudio realizado por Gibson (1975) sobre el consumo de C4-DCB en *R. sphaeroides*, se sugirió que hay un sistema transportador común para el malato, succinato y fumarato porque el consumo de cada uno de estos compuestos interfiere competitivamente con el consumo de los otros dos. También se determinó que el sistema transportador común es altamente selectivo con una KM de 0.8 μM para el fumarato, de 2.7 μM para el succinato y 2.3 μM para el malato, así como una velocidad máxima (V_{max}; nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína a 20 °C) de 50, 52 y 67, respectivamente.

Después del trabajo de Gibson (1975) no hay reportes sobre cuál podría ser el sistema transportador de C4-DCB al que hace referencia. En *R. capsulatus*, pariente cercano de *R. sphaeroides*, se determinó que el sistema transportador tipo TRAP, DctPQM, es el principal responsable del consumo de C4-DCB (Hamblin *et al.*, 1990, 1993; Shaw & Kelly, 1991).

Proteínas transportadoras codificadas en el genoma de *R. sphaeroides*

En la base de datos de transportadores membranales (<http://www.membranetransport.org/> Elbourne *et al.*, 2017) fueron identificados en el genoma de *R. sphaeroides* 2.4.1. 573 proteínas de sistemas transportadores, de las cuales el 65 % (372) corresponden a proteínas transportadoras dependientes de ATP y solo el 5.6 % (32) son proteínas que corresponden a

las diferentes subunidades de transportadores secundarios tipo TRAP. Entre las diferentes cepas de *R. sphaeroides* analizadas se distinguen variaciones en el porcentaje de proteínas de sistemas transportadores tipo TRAP (32, 36, 44 y 49 para las cepas 2. 4. 1, ATCC17025, ATCC17029 y KD131, respectivamente). En contraste, en el genoma de *R. capsulatus* se reconocen solo 10 genes que codifican para las diferentes subunidades de proteínas de transportadores tipo TRAP correspondientes al 2.14 % del total de las proteínas transportadoras. Sin embargo, la proporción de transportadores totales en relación con el genoma es igual en ambas especies (0.13) (Tabla 3).

Tabla 3 Comparación de proteínas transportadoras codificadas en el genoma

	<i>R. sphaeroides</i> 2. 4. 1	<i>R. capsulatus</i> SB1003
Total de proteínas transportadoras	573	467
Proteínas transportadoras tipo ABC	372	318
Proteínas transportadoras tipo TRAP	32	10
Otras	169	139
Tamaño del genoma (kb)	4603.06	3871.92
Total de ORFs	4242	3642
Proporción del total de transportadores con respecto al genoma	0.13	0.13
Proporción del total de transportadores tipo TRAP con respecto al genoma	0.007	0.003

Sistema transportador DctPQM

El primer sistema tipo TRAP descrito fue el transportador DctPQM de *R. capsulatus* (Forward, *et al.*, 1997). Los genes que codifican para las proteínas estructurales del sistema Dct (por **D**icarboxylic transport) de *R. capsulatus* están codificados en un operón tricistrónico, donde en primer lugar se encuentra el gen *dctP*, seguido por un terminador putativo independiente de Rho que genera que este gen sea transcrito en mayor proporción que el resto de los genes del operón, *dctQ* y *dctM*. La proteína DctP tiene un péptido señal que se remueve durante la

translocación de la proteína al periplasma, donde la proteína madura es un componente abundante.

En esta especie, la transcripción del operón *dctPQM* está bajo el control del sistema de dos componentes formado por la cinasa de histidina DctS y el regulador de respuesta DctR. Los genes que codifican para estas proteínas regulatorias están acoplados y se agrupan en un operón localizado río arriba de *dctPQM*. Ambos operones son transcritos de forma divergente (Figura 9). Se ha propuesto que los elementos del promotor de estos genes se localizan en la región intercistrónica *dctS-dctP* y que el posible motivo de unión de DctR es TTGCGGN4CCGCAACT (Davies, *et al.*, 1999; Forward, *et al.*, 1997; Golby *et al.*, 1999; Wyborn *et al.*, 2001).

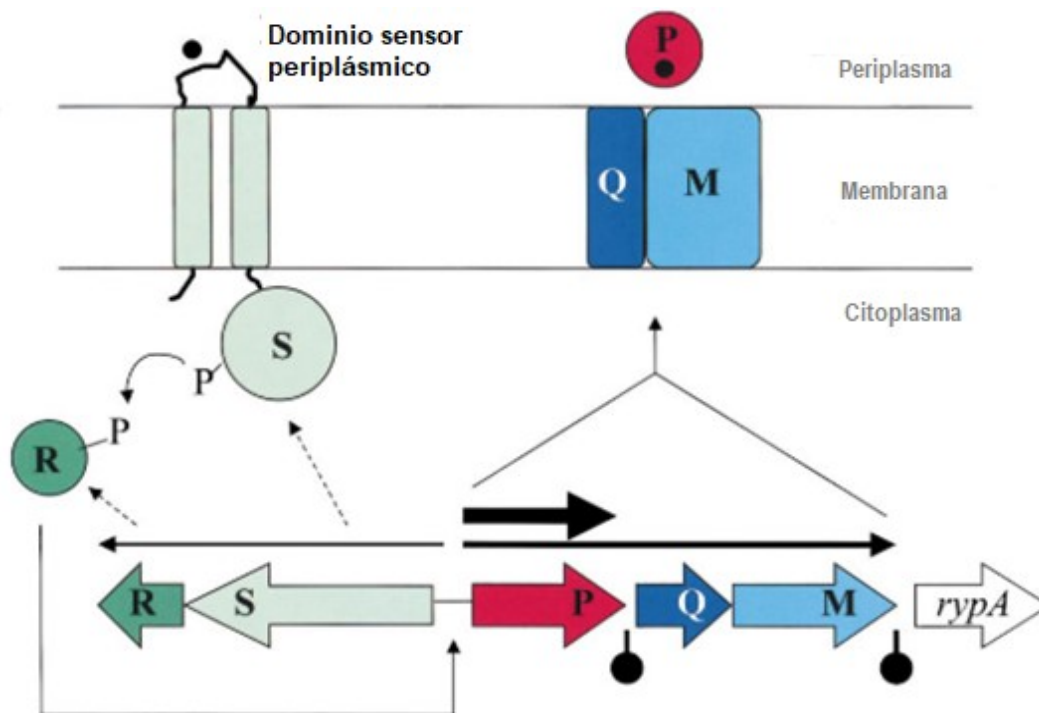


Figura 9 Esquema que representa la organización estructural y regulatoria del sistema Dct en *R. capsulatus*. La presencia de un terminador transcripcional parcial se ubica entre los genes *dctP* y *dctQ* y entre *dctM* y *rypA* se encuentra el terminador transcripcional del operón *dctPQM*. Las flechas negras sólidas horizontales simbolizan la dirección e intensidad de la transcripción (Kelly & Thomas, 2001).

Se han construido mutantes en cada uno de los elementos estructurales y regulatorios del sistema Dct de *R. capsulatus*. En esta especie, DctPQM constituye el único transportador funcional de succinato, D-malato, L-malato y fumarato durante el crecimiento heterotrófico y es el principal sistema transportador de estos compuestos durante el crecimiento fotoheterotrófico (Tabla 4), donde, en ausencia de DctPQM funciona un transportador de baja afinidad para los C4-DCB, el cual aún no ha sido identificado. La interrupción de los genes *dctS* y *dctR* deriva en la ausencia de la transcripción de los genes *dctPQM*. Se determinó que en las mutantes en el sistema Dct se afecta el transporte de C4-DCB, pero no el metabolismo del carbono ya que las actividades específicas de las enzimas relacionadas con los ácidos C4-dicarboxílicos en el ciclo TCA no difieren entre la cepa silvestre y las cepas Dct- (Hamblin *et al.*, 1990, 1993; Shaw *et al.*, 1991a).

Tabla 4. Crecimiento de la cepa silvestre y las cepas mutantes Dct- de *R. capsulatus*

Cepa	Tasa de crecimiento (tiempo de duplicación en horas)							
	Crecimiento heterotrófico				Crecimiento fotoheterotrófico			
	Piruvato*/ Lactato**	Malato	Succinato	Fumarato	Piruvato*/ Lactato**	Malato	Succinato	Fumarato
A PAS100 <i>dct+</i>	4.0 *	5.0	4.0	4.0	4.0*	4.0	4.0	4.0
B <i>dctS::Ω</i>	4.0*	NC	NC	NC	3.5*	7.0	16.0	NC
C <i>dctR::Ω</i>	3.0*	NC	NC	NC	2.0*	7.5	7.5	NC
D PAS100 <i>dct+</i>	5.5**	7.5	7.3	7.0	6.3**	8.4	6.0	7.5
E <i>dctP::Ω</i>	6.5**	NC	NC	NC	5.8**	11.8	11.0	18.8
F <i>dctQ::km</i>	3.4**	NC	NC	NC	3.1**	10.0	17.5	15.0
G <i>dctM::Ω</i>	3.3**	NC	NC	NC	5.0	14.3	17.5	23.5

A-C Hamblin *et al.*, 1993

D-G Forward *et al.*, 1997

NC No crecen

La cinasa DctS tiene un 31 % de identidad con FixL de las Rhizobiales, contiene dos segmentos transmembranales en su región N-terminal, un fragmento periplásmico de 200 aminoácidos sin un dominio predecible, un dominio PAS citoplásmico asociado a un motivo

PAC, el dominio cinasa de histidina (DHp) y el dominio catalítico (CA) en su extremo C-terminal. DctR conserva mayor grado de similitud con los reguladores de respuesta de la familia FixJ de las Rhizobiales (42 %) y en su región N-terminal tiene un 28 % de similitud con DctD de *E. coli* (Hamblin *et al.*, 1993; Valentini *et al.*, 2011).

En *Pseudomonas aeruginosa* el sistema DctPQM es regulado positivamente por el sistema de dos componentes DctBD y por el factor σ^{54} (RpoN) que además regulan la expresión del gen que codifica para el transportador DctA (Valentini *et al.*, 2011). La bacteria anaeróbica obligada *Wolinella succinogenes* es parte del microbiota de los rumiantes, crece llevando a cabo respiración por fumarato y utiliza a homólogos del sistema DctPQM (44 %, 22 % y 49 % de identidad con DctPQM de *R. capsulatus*) y a homólogos de DctA y DcuB de *E. coli* para transportar a los C4-DCB (Ullmann *et al.*, 2000).

Los únicos antecedentes de transportadores de ácidos C4-DCB en bacterias fotosintéticas son el sistema Dct de *R. capsulatus*, el transportador de C4-DCB dependiente de Na^+ de la bacteria fotosintética sulfurosa *Ectothiorhodospira shaposhniko* (Karzanov & Ivanovsky, 1980) y el reporte de Gibson (1975) en *R. sphaeroides*, donde caracterizó el transporte de C4-DCB desde el punto de vista bioquímico. Sin embargo, no se identificó al o a los sistemas transportadores responsables. Dado que los C4-DCB son los compuestos usados más comúnmente como fuentes de carbono en los medios de cultivo de *R. sphaeroides*, la caracterización de su o sus sistemas transportadores es una aportación importante en el campo de la fisiología de este tipo de bacterias.

Hipótesis

1. De acuerdo con los estudios bioquímicos de Gibson hechos en *R. sphaeroides*, donde se propone que en esta especie los ácidos C4-dicarboxílicos málico, succínico y fumárico son transportados por un sistema común y tomando en cuenta el papel del transportador DctPQM en *R. capsulatus*, es posible que un sistema homólogo a DctPQM sea el transportador específico y esencial para el crecimiento de *R. sphaeroides* en un medio con C4-DCB como única fuente de carbono.
2. Debido a la regulación que los sistemas transportadores de C4-DCB ejercen sobre las cinasas de histidina responsables de modular su expresión, se propone que en *R. sphaeroides* algún elemento del transportador DctPQM formará parte esencial en la transducción de señales del sistema DctSR.

Objetivo general

Caracterizar los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión del o los transportadores de ácidos C4-dicarboxílicos en *R. sphaeroides*.

Objetivos particulares

- Identificar homólogos de sistemas transportadores de C4-DCB en *R. sphaeroides*.
- Construir mutantes en el sistema transportador de C4-DCB DctPQM.
- Evaluar la capacidad de cada una de estas mutantes para crecer hetero y fotoheterotróficamente usando al ácido succínico como única fuente de carbono.
- Identificar la región promotora de *dctPQM*.
- Evaluar la regulación de la transcripción de los genes del sistema transportador.

Métodos

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y plásmidos empleados en este trabajo se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripción de las cepas y plásmidos usados en este trabajo		
Cepa/ plásmido	Descripción	Referencia
Cepa		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
WS8N	Cepa silvestre WS8 con resistencia espontánea a nalidíxico NaI ^r	Sockett <i>et al.</i> , 1990
AM1	Derivada de WS8N; $\Delta fleQ::Kan$ cckA _{L391F}	Del Campo <i>et al.</i> , 2007
VS1	Derivada de AM1; $\Delta dctPQM::Hyg$	Este trabajo
VS2	Derivada de AM1; $\Delta dctR::Hyg$	Este trabajo
VS3	Derivada de AM1; $\Delta dctS::Hyg$	Este trabajo
VS4	Derivada de AM1; $\Delta dctR::Rif$ $\Delta dctPQM::Hyg$	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
LMG194	Cepa de expresión de proteínas; F- $\Delta lacX74$ galE thi rpsL $\Delta phoA$ (Pvu II) $\Delta ara714$ leu::Tn10	Invitrogen
TOP10	Cepa de clonación; F- mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ recA1 araD139 $\Delta(araA-leu)7697$ galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen
GM2199	Cepa de clonación que no posee el sistema de metilación Dam	Marinus <i>et al.</i> , 1983
Helper	HB101 pRK2013	Boyer & Rovland-Dvsooix, 1969
Plásmido		
pCR 2.1 TOPO	Vector de clonación; Amp ^r Kan ^r , pUC ori + f1 ori	Thermofisher
pCR 4.1 TOPO	Vector de clonación; Amp ^r Kan ^r , pUC ori	Thermofisher
pTZ18REco-	Vector de clonación; Amp ^r sin el sitio EcoRI-	Colección de laboratorio
pTZ19R/ pTZ18R	Vector de clonación; Amp ^r	Pharmacia
pJQ200mp18	Vector suicida oriT+ traJ+ de <i>R. sphaeroides</i> ; Gm ^r	Quandt & Hynes, 1993
pRK415	Vector de expresión en <i>R. sphaeroides</i> ; Tc ^r	Keen <i>et al.</i> , 1988
pBAD-HisB	Vector de expresión de proteínas etiquetadas con His6X; Ap ^r	Invitrogen

Plásmido	Descripción	Referencia
pIND4	Vector de expresión inducible con IPTG para <i>R. sphaeroides</i>	Ind <i>et al.</i> , 2009
pINDGm	pIND4 con el marcador de resistencia a Gm ^r	Colección de laboratorio
pBBMCS53	Vector con fusión transcripcional <i>uidA</i> ; Gm ^r	Girard <i>et al.</i> , 2000
pPIRL	Vector que codifica tRNAs para codones raros; Cm ^r	Bao & Cohen, 2001
pWM5	Vector fuente del casete <i>uidA-aadA</i>	Metcalfe & Wanner, 1993
pTZnPTHyg	Vector pTZ19R con el casete de resistencia a higromicina proveniente del vector pB45	Colección de laboratorio
pB45	Vector fuente del casete de resistencia a higromicina	Servin-Gonzalez <i>et al.</i> , 1995
pCHYC3	Vector de clonación con el casete de resistencia a Rif	Thanbichler <i>et al.</i> , 2007
PCR_Rif	Vector derivado de pCR-Blunt II-TOPO portando el casete de resistencia a Rifampicina (proveniente del vector pCHYC3)	Hernández-Valle, 2016
pTOPO_rpdctPQM	Vector pCR2.1 TOPO con el promotor del operón <i>dctPQM</i>	Este trabajo
pTOPO_rpdctSR	Vector pCR4.0 TOPO con el promotor del operón <i>dctSR</i>	Este trabajo
pTOPO_dctScomp	Vector pCR2.1 TOPO con el gen <i>dctS</i>	Este trabajo
pTOPO_dctPQMUp-down	Vector pCR2.1 TOPO con la región río arriba y río abajo del operón <i>dctPQM</i>	
pTZEco-dctPQMUp-down	Vector pTZ18R con los fragmentos <i>dctPQMA</i> y <i>dctPQMB</i>	Este trabajo
pTZEco-dctRUp-down	Vector pTZ18R (EcoRI-) con los fragmentos <i>dctRup</i> y <i>dctRdown</i>	Este trabajo
pTZEco-dctSUp-down	Vector pTZ18R (EcoRI-) con los fragmentos <i>dctR1</i> y <i>dctR2</i>	Este trabajo
pTZEco-dctPQMUp-hyg-down	Vector pTZ18R con los fragmentos <i>dctPQMA</i> + <i>hyg</i> + <i>dctPQMB</i>	Este trabajo
pTZEco-dctRUp-hyg-down	Vector pTZ18R (EcoRI-) con los fragmentos <i>dctRup</i> + <i>Hyg</i> + <i>dctRdown</i>	Este trabajo
pTZEco-dctRUp-Rif-down	Vector pTZ18R (EcoRI-) con los fragmentos <i>dctRup</i> + <i>Rif</i> + <i>dctRdown</i>	Este trabajo
pTZEco-dctSUp-hyg-down	Vector pTZ18R (EcoRI-) con los fragmentos <i>dctS1</i> + <i>hyg</i> + <i>dctS2</i>	Este trabajo
pTZ_dctPQM	Vector pTZ19R con el operón <i>dctPQM</i> completo	Este trabajo
pTZ_dctR	Vector pTZ19R con el gen <i>dctR</i>	Este trabajo
pTZ_dctScomp	Vector pTZ19R con el gen <i>dctS</i>	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pTZ_dctSRcomp	Vector pTZ19R con los genes <i>dctSR</i>	Este trabajo
pTZ_dctR _{D53E}	Vector pTZ19R con el gen mutante <i>dctR_{D53E}</i>	Este trabajo
pTZ_dctP _{pIND}	Vector pTZ19R con el gen <i>dctP</i> flanqueado con los sitios de restricción BamHI y HindIII	Este trabajo
pTZ_dctP _{pBAD}	Vector pTZ19R con el gen <i>dctP</i> flanqueado con los sitios de restricción EcoRI y HindIII	Este trabajo
pJQ_dctPQMUp-hyg-down	Vector pJQ200mp18 con el alelo Δ <i>dctPQMA::Hyg</i>	Este trabajo
pJQ_dctRUp-hyg-down	Vector pJQ200mp18 con el alelo Δ <i>dctR::Hyg</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>dctR::rif</i>	Vector pJQ200mp18 con el alelo Δ <i>dctR::Rif</i>	Este trabajo
pJQ_Δ <i>dctS::hyg</i>	Vector pJQ200mp18 con el alelo Δ <i>dctS::Hyg</i>	Este trabajo
pRK_dctPQM	Vector pRK415 con el operón <i>dctPQM</i> completo	Este trabajo
pRK_dctR	Vector pRK415 con el gen <i>dctR</i> completo	Este trabajo
pRK_dctR _{D53E}	Vector pRK415 con el gen <i>dctR_{D53E}</i>	Este trabajo
pRK_dctS	Vector pRK415 con el gen <i>dctS</i>	Este trabajo
pRK_dctSR	Vector pRK415 con los genes <i>dctSR</i>	Este trabajo
pRK415_uidA-aadA	Vector pRK415 con el gen <i>uidA</i> codificante de la β -glucuronidasa y el casete de resistencia a espectinomomicina <i>aadA</i>	Colección del laboratorio
pRK_rpdctPQM	Vector pRK415_uidA-aadA con el promotor del operón <i>dctPQM</i>	Este trabajo
pBADHis_dctR	Vector pBAD HisB con el gen <i>dctR</i>	Este trabajo
pBADHis_dctR _{D53E}	Vector pBAD HisB con el gen <i>dctR_{D53E}</i>	Este trabajo
pBADHis_dctP	Vector pBAD HisB con el gen <i>dctP</i>	Este trabajo
pINDGm_dctPQM	Vector pINDGm con el operón <i>dctPQM</i> completo	Este trabajo
pINDGm_dctQM	Vector pINDGm con los genes <i>dctQM</i>	Este trabajo
pINDGm_dctP	Vector pINDGm con el gen <i>dctP</i>	Este trabajo
BBgus_rpdctPQM	Vector pBB1GUS con el promotor del operón <i>dctPQM</i>	Este trabajo
BBgus_rpdctSR	Vector pBB1GUS con el promotor del operón <i>dctSR</i>	Este trabajo

Los oligonucleótidos específicos usados en este trabajo fueron sintetizados en Oligo T4[®] (Irapuato Guanajuato, México) y se enlistan en la tabla 6:

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos usados			
Nombre (Sitio de restricción)	Secuencia 5' - 3'	Nombre (Sitio de restricción)	Secuencia 5' - 3'
DctRupFW (XbaI)	gctctagaaacagccgggtcaagca	DctRdownFw (EcoRI)	gccaattcgaggcgaagaggaacgaga
DctRupRv (EcoRI)	gcgaattccaagcagatcgccgaca	DctRdownRv (XbaI)	gctctagagcgcgatgagctgaacca
RPdctSPF (EcoRI)	cggaattcgcgtagcggccgctgcccggc	DctRcompRV (HindIII)	cccaagcttctgaacatctgccgcac
ΔDctS1F (XbaI)	gctctagaggcgcgatctgctgttgagc	ΔDctS2F (EcoRI)	gcgaattcagcgtctgctcgacccaaa
ΔDctS1R (EcoRI)	gcgaattcgaacatctgccgcaccatc	ΔDctS2R (XbaI)	gctctagattgaagatgtagggcaggctcg
RPdctSPR (XbaI)	gctctagacctgccagagcggcgaggctgcg	DctRScRv (EcoRI)	cggaattctcatctgatcctgagcgggacc
DctPQMA1 (XbaI)	gctctagatccatcagcgcgatagacc	DctPQMB1 (EcoRI)	gcgaattctctccatctgtgctcatc
DctPQMA2 (EcoRI)	gcgaattcacgacgtggctgaacttg	DctPQMB2 (XbaI)	gctctagagctcttctatccgggtgatgaa
DctPQMF (BamHI)	gcggatcctcgcgactggcaaggaagg	DctPQMR (EcoRI)	gcgaattcgcggtcagcgcgatgccca
DctRA (EcoRI)	ccggaattcacagggtagcgtccatatcat	pINDPQMR (HindIII)	cccaagcttgcggtcagcgcgatgccca
pBADdctP Fw (EcoRI)	ccggaattccagccgatcgtcatcaagttcag	DctRB (HindIII)	cccaagctttcatcctgatcctgagcg
RPdctPQM1 (XbaI)	gctctagagcgtgtagcggccgctgcccggc	pBADdctP Rv (HindIII)	cccaagcttccggatgggtcagttggtcc
ΔdctPA	cgtagcagcagcagcgtggctgaacttgatg	RPdctPQM2 (EcoRI)	cggaattcccctgccagagcggcgaggctgcg
Rif1 (BglII)	gcagatctcaactggtccagaaccttg	ΔdctPB	cgtagacatcgccaaggaagagaaggac
Fw_hygrouniv (BamHI)	gcggatcccgggcccagctccgcatcgcc	Rif2 (BglII)	gcagatctgtaatttcaataacatg
c159g_1	ccccatccgcacctcgagcatgatgc	Rv_hygrouniv (BamHI)	gcggatccggcggcccgggcgctcagggc
c159g_2	gcatcatgctcggcgtgaggatggggg		

Métodos microbiológicos

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Crecimiento de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas heterotróficamente a 37°C con agitación constante a 250 rpm en medio Luria- Bertani o LB (Ausubel *et al.*, 1987) cuya composición es: 1 % bacto-triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % de cloruro de sodio y para medio sólido se adicionó 1.5 % de bacto-agar.

Crecimiento de *R. sphaeroides*

R. sphaeroides fue cultivada en medio mínimo Sistrom (MMS; Sistrom, 1960) cuya composición se enlista en la tabla 7.

Nombre	Fórmula	Concentración (mM)	g para 1 l
Ácido nitriloacético	C ₆ H ₉ NO ₆	1.04	0.20
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	20	2.72
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	37.8	0.50
Ácido succínico (a)	C ₄ H ₆ O ₄	34 0.1	3.98 0.011
L-ácido glutámico	HO ₂ CCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	0.67	0.113
L-ácido aspártico	HO ₂ CCH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	0.3	0.04
Cloruro de sodio	NaCl	8.5	0.5
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.2	0.3
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.23	0.0334
Sulfato de hierro (II)	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.16	0.002
Molibdato de amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1.71x10 ⁻⁸	solución 1 % (0.02 mL)
Solución de elementos traza (b)			0.1 mL
Solución de vitaminas (c)			0.1 mL

Ajustar el pH a 7 con KOH

(a) El ácido succínico se sustituyó por una de las siguientes fuentes de carbono alternativas:

Nombre	Fórmula	Concentración	g para 1 l
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₄	34 mM	3.98
Ácido fumárico	C ₄ H ₆ O ₄	34 mM	3.98
Ácido pirúvico	C ₃ H ₄ O ₃	20 mM	1.761
Casaminoácidos		0.2 %	2

(b) Solución de elementos traza (100 mL)

Nombre	Fórmula	Concentración (mM)	g para 100 mL
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	4.7	0.1765
Sulfato de Zinc heptahidratado	ZnSO ₄ 7 H ₂ O	38	1.095
Sulfato de hierro (II)	FeSO ₄ 7 H ₂ O	18	0.5
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ H ₂ O	9	0.154
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	CuSO ₄ 5 H ₂ O	1.5	0.0392
Nitrato de cobalto hexahidratado	Co(NO ₃) 6 H ₂ O	0.9	0.0248
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	1.8	0.0114
Agregar H ₂ SO ₄ gota a gota hasta que la disolución se aclare, guardar a 4°C			

(c) Solución de vitaminas (100 mL)

Nombre	Formula	Concentración (mM)	g para 100 mL
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.0812	1
Hidrocloruro de tiamina	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS, HCl	0.0148	0.5
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.000409	0.01
Esterilizar por filtración y agregar al medio previamente esterilizado, se guardó a 4°C			

Cuando se requirió, se adicionaron antibióticos en las siguientes concentraciones (tabla 8):

Tabla 8. Concentración de antibióticos en los medios de cultivo

Nombre	Abreviatura	Stock Concentración	Concentración en el medio de cultivo (µg mL ⁻¹)	
		mg mL ⁻¹ (%)	<i>R. sphaeroides</i> (MMS)	<i>E. coli</i> (LB)
Ácido nalidíxico	Nal	5 (0.5)	20	---
Tetraciclina	Tc	2.5 (0.25)	1	15
Espectinomomicina	Sp	50 (0.5)	50	50
Kanamicina	Km	50 (0.5)	25	50
Gentamicina	Gm	3 (0.3)	3	30
Higromicina	Hyg	50	20 (150 en placa)	150
Rifampicina	Rif	(0.5)	0.25 (1 en placa)	25 (50 en placa)
Ampicilina	Amp	25 (2.5)	---	100
Cloranfenicol	Cm	10 (1)	---	20

Condiciones de cultivo y monitoreo del crecimiento de *R. sphaeroides*

Las cepas de *R. sphaeroides* fueron cultivadas a 30°C en MMS con 34 mM de ácido succínico como fuente de carbono o sustituyendo éste por 0.1 mM de ácido succínico o alguna de las fuentes de carbono enlistada en la tabla 7 (a).

Para los cultivos líquidos, las condiciones de crecimiento heterotróficas se obtuvieron al incubar un cultivo con el 10 % del volumen total del recipiente como máximo, manteniendo agitación constante a 200 rpm. Para obtener las condiciones de crecimiento fotoheterotróficas se usaron viales de vidrio rellenos a tope y expuestos a iluminación constante con focos de tungsteno de 40 watts a 30 cm de distancia. Para los cultivos sólidos se utilizó el mismo medio, pero adicionado con 1.5 % de bacto-agar y en el caso del crecimiento fotoheterotrófico en cajas de agar, se usaron jarras de anaerobiosis con sobres BD GasPak™ EZ Anaerobic Container System.

Los cultivos en fase de crecimiento exponencial tardía fueron centrifugados a $2\ 795 \times g$ por 5 min para recuperar las células. La pastilla celular fue lavada tres veces con MMS libre de carbono. Después del último lavado, la pastilla celular fue resuspendida en MMS adicionado con la fuente de carbono de interés. La densidad óptica inicial del cultivo medida a 600 nm fue de 0.15. Para la curva de crecimiento en condiciones fotoheterotróficas se inoculó un cultivo madre de 35 mL a una DO_{600nm} de 0.15 y con este se rellenaron 15 viales de 2.3 mL, los cuales se expusieron a la luz al mismo tiempo y cada vial correspondió a un punto de la curva.

El crecimiento celular fue monitoreado cada 3 horas en el espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent) o en el Nanodrop 2000 Thermo scientific. Los valores de DO_{600nm} fueron graficados en función del tiempo. El tiempo de duplicación se obtuvo al graficar el logaritmo natural de la densidad óptica contra el tiempo, donde, a partir de la ecuación de la recta en el crecimiento exponencial, la pendiente (m) se toma como la constante de velocidad de crecimiento (k) y para obtener el tiempo generacional se dividió el logaritmo natural de 2 entre k ($\ln 2/k$) (Buchanan, 1918). Se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes y se calculó la desviación estándar.

Métodos de biología molecular

Todos los reactivos usados fueron de grado biología molecular.

Extracción de DNA

A partir de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico tardío se tomaron 1.5 mL y se colectaron las células centrifugando a $2\ 236 \times g$ por 10 minutos. A este paquete celular se le añadieron 500 μL de amortiguador TE (50 mM de Tris-HCl pH 8.0; 5 mM de EDTA pH 8.0 y 50 mM de NaCl) más 60 μL de SDS al 10 % y proteinasa K a una concentración de 20 μg por mL. La suspensión se dejó lisar por 12 horas a 37°C . Posteriormente se añadieron 0.25 mL de fenol y 0.25 mL de cloroformo y se agitó hasta que se formó una emulsión blanca que fue centrifugada a $12\ 879 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente, la fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrifuga limpio y se repitió dos veces más este proceso. Para precipitar el DNA, a la fase acuosa de la última transferencia se le añadió acetato de sodio 3 M en una proporción 1/100 además de un volumen de isopropanol y se incubó a -20°C por una hora. Después se recuperó el DNA centrifugando a $12\ 879 \times g$ por 30 minutos a 4°C . Se resuspendió la pastilla de DNA con 100 μL de agua Milli-Q.

Amplificación del DNA

La amplificación de los fragmentos de DNA de interés se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). La composición y condiciones generales de la reacción fueron las siguientes: 1x de amortiguador PrimeSTAR GC (Takara); 10 % de DMSO; 0.25 mM de la mezcla de dNTPs (stock 2 mM); 1 μM de oligonucleótido sentido (Fw); 1 μM de oligonucleótido antisentido (Rv); 100 ng de DNA y 1 U de la DNA polimerasa Prime STAR HS (TAKARA). Los oligonucleótidos específicos se enlistan en la tabla 6.

La secuencia estándar programada en el termociclador fue: 95°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial; 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 35 segundos, seguidos de $56-62^\circ\text{C}$ por 15 segundos para alinear y, por último, 72°C por 1 minuto por cada 1000 pares de bases a polimerizar. Finalmente se hizo una extensión de 72°C por 10 minutos. Las variaciones a la composición y condiciones generales de esta reacción se indican en el experimento correspondiente.

Extracción y purificación de plásmidos

Se usaron dos métodos de extracción y purificación de plásmidos: el primero fue un protocolo de minipreparaciones hervidas en el que, a partir de un cultivo con la cepa portadora del plásmido de interés, se colectan las células por centrifugación a 12 879 x g por 8 minutos. El paquete celular se resuspendió en 300 µL de amortiguador STET (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 8 % de sacarosa y 50 mM de EDTA pH 8.0) más 25 µL de lisozima (10 mg/mL). Esta suspensión se hirvió por 45 segundos e inmediatamente después se centrifugó a 12 879 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se agregaron 300 µL de alcohol isopropílico frío, se mezcló perfectamente y se centrifugó a 12 879 x g por 18 minutos a 4°C. La pastilla de DNA se lavó con etanol al 70 %, se secó a 70 °C y se resuspendió en 35 µL de agua estéril MilliQ.

La purificación de plásmido con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep, se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (<https://www.qiagen.com/>).

Todos los plásmidos obtenidos fueron analizados en un gel de agarosa al 1 % y en el caso de los plásmidos purificados con el kit fueron también cuantificados al medir su absorbancia a 260 nm en el Nanodrop 2000 Thermo scientific.

Digestión, desfosforilación y ligación de DNA

Estas técnicas de manipulación de DNA fueron llevadas a cabo con enzimas de los siguientes proveedores: Roche (Basel, Switzerland), Invitrogen (Carlsband, CA) y New England Bioloabs (NEB, Ipswich, MA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Protocolos para la preparación de células competentes y su transformación

Para la introducción de los plásmidos de interés en las cepas de *E. coli* receptoras se utilizaron, a conveniencia, dos técnicas de transformación bacteriana:

- a) Transformación por el método de CaCl₂: A partir de un cultivo crecido hasta saturación de la cepa de interés de *E. coli*, se inocularon 10 mL de medio LB y el nuevo cultivo se incubó a 37°C con agitación constante a 200 rpm hasta que llegó a una DO_{600nm} de 0.4-0.6. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 2 795 x g por 5 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido

cuidadosamente en 6 mL de 100 mM de CaCl₂ estéril y se incubó por 30 minutos en hielo. Las células fueron colectadas nuevamente por centrifugación en las mismas condiciones y resuspendidas en 600 µL de 100 mM de CaCl₂ estéril y se dejaron reposar a 4°C entre 3 y 12 horas (Cohen *et al.*, 1972). Se tomó una alícuota de 200 µL de estas células, a la cual se le adicionaron 10 a 15 ng/µL del plásmido y se incubó por 30 minutos en hielo. Posteriormente, se sometió a un choque térmico a 42°C por 2 minutos y se enfrió en hielo por dos minutos más. Para recuperar las células, se agregaron 800 µL de medio LB y se incubó por 60 minutos a 37°C con agitación constante de 200 rpm. Finalmente, las células se colectaron por centrifugación a 2 236 x g por 2 minutos y la selección de transformantes se llevó a cabo en cajas con medio selectivo (Sambrook & Russell, 2001).

b) Transformación por electroporación: a partir de un cultivo en fase estacionaria de la cepa de *E. coli* de interés, se inocularon 10 mL de medio LB y el nuevo cultivo se incubó a 37°C con agitación constante hasta que alcanzó una DO_{600nm} de 0.5 a 0.7. Posteriormente, el cultivo se mantuvo en hielo por 15 minutos y después las células se recuperaron al centrifugar por 10 minutos a 2 236 x g a 4°C. En condiciones estériles se eliminó por completo el sobrenadante. El paquete celular se lavó 2 veces con 10 mL de glicerol 10 % (v/v) estéril y se mezcló suavemente hasta suspender completamente. Nuevamente se centrifugó a 2 236 x g por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, las células se resuspendieron en el glicerol residual. En este punto se congelaron para usarse posteriormente (se guardan en alícuotas pequeñas a -80°C).

A una alícuota de 40 µL de células electrocompetentes se le agregaron 50 ng de la reacción de ligación o del plásmido de interés, se colocó en una celda de electroporación (BIORAD) enfriada previamente y se dio un pulso de 1.8 Kv con una resistencia igual a 200 Ω e inmediatamente después se colocó la celda en hielo por un minuto. Para recuperar a las células, se agregó 1 mL de medio LB y se incubó por 50 minutos a 37°C a 200 rpm. Finalmente, se colectaron las células por centrifugación a 2 236 x g por 5 minutos y se seleccionaron las transformantes sembrándolas en cajas Petri con medio selectivo.

Conjugación

Los plásmidos con las construcciones de interés fueron transferidos entre las cepas mediante conjugación triparental, donde, la cepa AM1 de *R. sphaeroides* fue la cepa receptora, la cepa TOP10 de *E. coli* transformada con el plásmido de interés fue la cepa donadora y adicionalmente se usó la cepa HB101 de *E. coli* denominada “Helper” porque contiene el plásmido pRK2013 y el grupo de genes necesarios para la transferencia de los plásmidos con *oriT*. El protocolo que se siguió fue el reportado por Davis y colaboradores (1988).

Aislamiento de mutantes

Todas las mutantes usadas en este trabajo fueron obtenidas por remplazamiento utilizando el plásmido suicida pJQ200mp18 que lleva el alelo mutante. Todas las mutantes fueron verificadas por PCR control o por secuenciación.

VS1 (Δ dctPQM). Para la obtención de la mutante VS1 (Δ dctPQM::Hyg) se usaron los oligonucleótidos específicos: DctPQMA1 y DctPQMA2 que amplifican el fragmento de 739 pb denominado Δ dctPQMUp y los oligonucleótidos DctPQMB1 y DctPQMB2 que amplifican un fragmento de 675 pb denominado Δ dctPQMdown. Se purificaron los fragmentos obtenidos usando el estuche QIAquick PCR Purification de Qiagen y se digirieron con *EcoRI*. Se ligaron ambos fragmentos y se hizo una PCR con los oligos DctPQMA1- DctPQMB2. El amplicón resultante de 1414 pb fue clonado en el plásmido pCR2.1TOPO resultando el vector pTOPO_dctPQMUp-down el cual fue transformado en la cepa GM2199 Dam- debido a que en el oligonucleótido DctPQMA se encuentra un sitio de metilación del sistema Dam (DNA-metiltransferasa). El plásmido pTOPO_dctPQMUp-down se purificó y digirió con *XbaI* para liberar el fragmento dctPQMUp-down que fue subclonado en el plásmido pTZ18REco-. El plásmido pTZEco-_dctPQMUp-down fue purificado y digerido con *EcoRI*.

Previamente, el casete de resistencia a higromicina (Hyg^r; de 1655 pb), contenido en el vector pTZnPThyg y proveniente del plásmido pB45, fue amplificado con los oligonucleótidos: Fw_hygrouniv y Rv_hygrouniv. Se hizo una reacción T4 polimerasa y se ligó el casete de resistencia a higromicina previamente digerido con *SmaI*. Obteniéndose así, el plásmido pTZEco-_dctPQMUp-hyg-down. Este plásmido fue transformado en la cepa GM2199 Dam-, purificado y digerido con la enzima *XbaI*. El fragmento obtenido de 3069 pb fue purificado y

clonado en el plásmido suicida pJQ200mp18. El vector resultante pJQ_dctPQMUp-hyg-down fue transformado en la cepa TOP10. La cepa anterior se utilizó para hacer una conjugación triparental.

VS2 (Δ dctR). Para la construcción de la mutante VS2 (Δ dctR::Hyg) se usaron los oligonucleótidos específicos: DctRupFW y DctRupRv que amplifican un fragmento de 703 pb denominado dctRUp y los oligos DctRdownFw y DctRdownRv que amplifican el fragmento de 727 pb denominado dctRdown. Se purificaron los fragmentos obtenidos y se digirieron con *Eco*RI. Se ligaron ambos fragmentos y se hizo una PCR con los oligos DctRupFw-DctRdownRv, el amplicón resultante de 1420 pb fue digerido con la enzima *Xba*I para ser clonado en el plásmido pTZR18*Eco*-. El vector pTZ*Eco*-_dctRup-down fue digerido con *Eco*RI, para eliminar los extremos cohesivos se hizo una reacción T4 polimerasa. El fragmento Hyg^r fue ligado al pTZ*Eco*-_dctRup-down. Obteniéndose el plásmido pTZ*Eco*-_dctRUp-hyg-down. El fragmento dctRUp-hyg-down de 3075 pb fue liberado al digerir con *Xba*I, se purificó y subclonó en el plásmido suicida pJQ200mp18. Obteniéndose el plásmido pJQ_dctRUp-hyg-down que fue transformado en la cepa TOP10. La cepa anterior se utilizó para hacer una conjugación triparental.

VS3 (Δ dctS). Para el aislamiento de la cepa VS3 (Δ dctS) el alelo mutante fue obtenido siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la mutante VS2, pero con los oligonucleótidos específicos Δ DctS1F y Δ DctS1R para amplificar un fragmento de 608 pb y los oligonucleótidos Δ DctS2F y Δ DctS2R para amplificar el fragmento de 709 pb que permiten eliminar 429 pb de la región codificante del gen *dctS* sustituyéndola por el casete de resistencia a higromicina.

VS4 (Δ dctPQM- Δ dctR). Para obtener la cepa mutante carente del regulador de respuesta DctR y de las proteínas del transportador DctPQM, se utilizó el plásmido pTZ*Eco*-_dctRup-down, previamente descrito, el cual se digirió con *Eco*RI y se hizo una reacción T4 polimerasa para eliminar los extremos cohesivos. Previamente, se usaron los oligonucleótidos específicos Rif1 y Rif2 para amplificar el casete de resistencia a rifampicina (Rif) contenido en el plásmido pCR_Rif (el casete proviene del vector pCHYC3; Hernández Valle, 2016; Tesis de licenciatura). Se ligaron el plásmido y el casete Rif, obteniéndose el plásmido pTZ*Eco*-_dctRUp-Rif-down el cual fue digerido con *Xba*I para liberar al fragmento dctRUp-Rif-down de

2088 pb, posteriormente este fragmento fue subclonado en el vector suicida pJQ200mp18 y conjugado en la cepa VS1.

Construcción de los plásmidos

pRK_dctPQM. Para la construcción del plásmido pRK_dctPQM se usaron los oligonucleótidos específicos: DctPQMF y DctPQMR que amplifican un fragmento de 3161 pb que fue purificado y digerido con las enzimas *Bam*HI-*Eco*RI. Este fragmento fue clonado en el vector pTZ19R obteniéndose el plásmido pTZ_dctPQM, el cual fue transformado en TOP10. Se purificó el plásmido y se digirió con las mismas enzimas para obtener el fragmento y subclonarlo en el plásmido pRK415. Posteriormente se transformó en la cepa TOP10.

pINDGm_dctPQM. Para la construcción del plásmido pINDGm_dctPQM se usaron los oligonucleótidos específicos: DctPQMF y pINDPQMR que amplifican un fragmento de 3161 pb, el cual fue purificado y digerido con las enzimas *Bam*HI-*Hind*III. Este fragmento fue clonado en el vector pINDGm y el plásmido resultante fue transformado en TOP10.

pINDGm_dctP. Para la construcción del plásmido pINDGm_dctP se usaron los oligonucleótidos específicos: DctPQMF y pBADdctPRv el producto de PCR de 936 pb fue digerido con las enzimas *Bam*HI- *Hind*III y clonado en el plásmido pTZ19R, así se obtuvo el plásmido pTZ_dctP_{pIND} el cual fue purificado y digerido con las mismas enzimas para obtener el fragmento *dctP* que fue subclonado en el plásmido pINDGm.

pINDGm_dctQM. Para la construcción del plásmido pINDGm_dctQM se usó como templado el plásmido pTZ_dctPQM y los oligonucleótidos específicos: ΔdctPA y ΔdctPB para hacer una PCR reverso que permitió eliminar 849 pb de la región codificante del gen *dctP*, así se conserva la región SD, 156 pb del gen *dctP* y la región intercistronica *dctP-dctQM*. El fragmento resultante de 2307 pb fue clonado en el vector pTZ19R, posteriormente fue digerido con *Sal*I y ligado. Para liberar el fragmento *dctQM* se digirió con las enzimas *Hind*III-*Bam*HI y se subclonó en el vector pINDGm obteniéndose el plásmido correspondiente que fue transformado en TOP10.

pRK_dctR. Para la construcción del plásmido pRK_dctR se usaron los oligonucleótidos específicos: DctRupFw y DctRcompRV que amplificaron un fragmento de 1302 pb, el cual fue purificado y digerido con las enzimas *Xba*I-*Hind*III. Este fragmento, que contiene el gen *dctR*

completo, fue clonado en el vector pTZ19R obteniéndose el plásmido pTZ_dctR que fue transformado en TOP10. Se purificó el plásmido y se digirió con las mismas enzimas para obtener el fragmento y subclonarlo en el plásmido pRK415 y posteriormente, el plásmido resultante fue transformado en la cepa TOP10.

pRK_dctS y pRK_dctSR. Los plásmidos pRK_dctS y pRK_dctSR fueron obtenidos usando los oligonucleótidos específicos RPdctSPR y DctRdownFw que amplifican un fragmento de 2216 que comprende el gen *dctS* completo más 174 pb río arriba del codón de inicio de este gen y los oligos RPdctSPR y DctRScRv amplificando un fragmento de 2841 correspondiente a 174 pb río arriba del gen *dctS*, más los genes *dctS* y *dctR* completos. En ambos casos, se clonó el fragmento obtenido en el plásmido pTZ18R y se subclonó en el plásmido pRK415 bajo el control del promotor *lac*.

pBADHis_dctP. Para la construcción del plásmido pBADHis_dctP se usaron los oligonucleótidos específicos: pBADdctPFw y pBADdctPRv que amplifican un fragmento de 927 pb donde está incluida la región codificante del gen *dctP* menos 78 pb que codifican para los 26 aminoácidos que corresponden al péptido señal predicho en el servidor Phobius Prediction (<https://phobius.sbc.su.se/>). Se cuidó que se conservara el marco de lectura adecuado. El producto de la reacción de PCR se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI-HindIII*, se purificó y se ligó en el plásmido pTZ19R previamente digerido, obteniéndose a pTZ_dctP_{pBAD}. Este plásmido fue purificado y digerido para liberar el fragmento *dctP*_{pBAD} el cual fue subclonado en el vector de expresión pBAD-HisB y seguidamente fue transformado en la cepa TOP10 a partir de la cual se purificó la proteína recombinante His₆XDctP.

pBADHis_dctR. Para la sobreexpresión de DctR, el gen *dctR* fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos específicos DctRA y DctRB, obteniendo un fragmento de 681 pb que fue clonado en el vector pBAD-HisB. La cepa LMG174 fue transformada con el plásmido pBADHis_dctR y el plásmido pPIRL, este último lleva clonados los genes correspondientes a los tRNA de prolina, arginina, isoleucina y leucina de uso poco frecuente en *E. coli* (Bao & Cohen, 2001; Chen & Texada, 2006).

pBADHis_dctR_{D53E}. Para obtener una versión del regulador de respuesta DctR en un estado conformacional que simula la activación constitutiva se hizo la mutación puntual en la tercera

base del codón que codifica para la asparagina 53 (GAC), cambiándose la citosina por una guanina con lo que ahora el codón codifica para la glutamina (GAG).

Se usaron los oligonucleótidos específicos c159g_1 and c159g_2 y el plásmido pTZ_dctR como molde. Después el fragmento amplificado fue incubado con *DpnI* para digerir el DNA parental de doble cadena superhelicoidal. La reacción fue transformada en la cepa TOP10. El plásmido pTZ_dctR_{D53E} fue secuenciado para confirmar la mutación puntual. El fragmento correspondiente a *dctR*_{D53E} liberado al digerir con *XbaI-HindIII*, fue purificado y clonado en el vector de expresión pBAD-HisB.

BBgus_rpdctPQM. Para la construcción del plásmido BBgus_rpdctPQM se usaron los oligonucleótidos específicos RPdctPQM1 y RPdctPQM2 con el objetivo de amplificar la región regulatoria del operón *dctPQM* (-175 a +34 con respecto al codón de inicio de *dctP*). Este fragmento de 210 pb se clonó directo en el plásmido pCR2.1 TOPO (obteniéndose pTOPO_rpdctPQM) y se subclonó en el plásmido pBBMCS53.

BBgus_rpdctSR. Para la construcción del plásmido BBGUS_rpdctSR se usaron los oligonucleótidos específicos: RPdctSPF y RPdctSPR que amplifican la región regulatoria del operón *dctSR* (-173 +37 con respecto al codón de inicio de *dctS*). Este fragmento de 210 pb se clonó directo en el plásmido pCR2.1 TOPO. Y se subclonó en el plásmido pBB1GUS.

pRK_rpdctPQM. A partir del plásmido BBgus_rpdctSR se liberó el fragmento de 210 pb que incluye a la región promotora del operón *dctPQM* con las enzimas de digestión *EcoRI-SacI*. En la colección del laboratorio se tenía el plásmido pRK415_uidA-aadA que se construyó al clonar el casete *uidA-aadA* (proveniente del vector pWM5; Metcalf and Wanner, 1993) en el sitio *BamHI* del pRK415. Previamente, este plásmido se digirió con *EcoRI-SacI* y en él se clonó el fragmento de la región intercistronica *dctS-dctP* obteniéndose el plásmido pRK_rpdctPQM que tiene al gen reportero *uidA-aadA* fusionado a la región promotora del operón *dctPQM* en sentido contrario al promotor *lac* del pRK415.

Métodos bioquímicos e inmunológicos

Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes His_{6x}-DctR, His_{6x}-DctR_{D53E} y His_{6x}-DctP fueron purificadas siguiendo el mismo protocolo general. Un cultivo de 30 mL de la cepa con el plásmido de expresión correspondiente fue cultivado en medio LB a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.5. En este punto se agregó 0.2 % de arabinosa para inducir la expresión de la proteína de interés por 4 horas. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 2 795 x g por 5 minutos y resuspendidas en un mL de amortiguador de lisis (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 300 mM de NaCl, 0.1 mM EDTA, 15 % de glicerol y 1 mg/mL de lisozima). El protocolo siguiente correspondiente a la lisis celular, fraccionamiento, unión a las perlas de Ni-NTA, lavado y elución fue realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante de Ni-NTA Agarose protocol (Qiagen). Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con diferentes extractos del proceso de purificación de cada una de las proteínas sobreexpresadas se presentan en el anexo 1.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína fue determinada usando el reactivo de Bradford, siguiendo las indicaciones del fabricante (Bio-Rad) y usando BSA (1 mg/mL) para la curva estándar. Se leyó la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Los geles de poliacrilamida fueron preparados de acuerdo con las proporciones indicadas en la tabla 9:

Tabla 9. Composición de los geles de poliacrilamida		
Reactivo	Gel separador (12 %)	Gel concentrador (4 %)
	µL	µL
Agua	A 6 mL	A 3 mL
Acrilamida (30 %) -Bisacrilamida (0.8 %)	2000	3125
Buffer separador (0.375 M Tris-HCl pH 8.8)	1800	-----
Buffer concentrador (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)	-----	325
Persulfato de amonio 1.5 %	40	20
TEMED	5	25
SDS	50	25

Los geles se corrieron a 20 mA por aproximadamente 40 minutos con amortiguador de electroforesis (0.025 M Tris, 0.192 M de glicina, pH 8.3; en el caso de los desnaturalizantes se les agregó 1 % de SDS) y se tiñeron sumergiéndolos en una disolución de 0.05 % azul de Coomassie R250, 40 % metanol y 10 % ácido acético. Posteriormente los geles se destiñeron en una solución con los mismos porcentajes de metanol y ácido acético.

Retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Las reacciones de unión proteína-DNA fueron llevadas a cabo a 30°C en amortiguador de reacción [20 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM MgCl₂, 1 μM β-mercaptoetanol y 0.1 mM EDTA] en un volumen total de 10 μL. La reacción además podía incluir 5 nM de DNA correspondiente al fragmento de 230 pb donde está comprendida la región promotora del operón *dctPQM* y/o un fragmento de 100 pb correspondiente a un segmento interno del gen *motF* como DNA competidor inespecífico. Se inició la reacción al agregar la proteína His₆DctR_{D53E} a una concentración de entre 0-4 μg. Después de 30 minutos de incubación, la reacción fue parada al agregar 1:1 de amortiguador de carga [7.2 mM Tris-HCl pH 7.9; 3.3 mM acetato de sodio pH 7.9, 1 mM EDTA, 80 % (v/v) glicerol; azul de bromofenol]. El gel de poliacrilamida en condiciones nativas (0.75 x 10 x 8 cm) de 10 % de acrilamida-bisacrilamida (40:2); 16.6 % de glicerol, 6.75 mM Tris-HCl pH 7.9, 3.3 mM acetato de sodio y 1 mM EDTA, fue precorrido a 10 mA en amortiguador de corrida TAE (7.2 mM Tris-HCl pH 7.9, 3.3 mM acetato de sodio pH 7.9 y 1 mM EDTA) con recirculación constante y enfriando el amortiguador en un baño de hielo. Posteriormente, se cargó la mezcla de reacción-amortiguador de carga y se corrió en frío a 10 mA por cerca de 150 minutos. Después de la electroforesis el DNA fue teñido con bromuro de etidio y observado en el transiluminador.

Actividad beta glucuronidasa

Para verificar la presencia de una región promotora y medir su actividad, se fusionó el fragmento de interés con el gen reportero *uidA* carente de su promotor/operador. El gen *uidA* codifica para la enzima β-glucuronidasa, al medir su actividad específica se puede correlacionar la actividad enzimática con el nivel de actividad del promotor de interés (Jefferson *et al.*, 1986).

Los extractos que fueron usados para medir la actividad β -glucuronidasa se obtuvieron de células que crecieron hasta la DO adecuada (ver para cada ensayo), las cuales se colectaron por centrifugación a $2\ 236 \times g$ por 5 minutos a partir de 1.5 mL del cultivo madre. La pastilla celular fue resuspendida en amortiguador de resuspensión (50 mM de fosfato de sodio pH 7, 10 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 % Triton X-100 y 10 mM EDTA). Las células se lisaron por ultrasonicación y se centrifugaron a $12\ 874 \times g$ por 2 minutos a 4°C . La reacción ocurrió en 340 μL de amortiguador de reacción [1 mM hidrato de 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) como sustrato, 50 mM Na_2HPO_4 pH 7; 10 μM β -mercaptoetanol; 10 mM EDTA y 0.1 % de Tritón X-100] y se inició al agregar 80 μL de la fracción soluble del extracto celular lisado. Se tomaron 3 alícuotas de 100 μL de la reacción en 3 tiempos diferentes y se mezclaron con 1.9 mL de amortiguador de paro (200 mM de Na_2CO_3). Se hizo una curva estándar de concentración del producto 4 metilumbeliferona (MU). Se midió la fluorescencia en el fluorómetro MH116 SLM Aminco Expectrum Processor version 1.7.2 (365 nm de excitación y 455 nm de emisión). La actividad específica es expresada en nanomoles de MU por minuto por miligramo de proteína.

Obtención de anticuerpos

El suero con anticuerpos policlonales fue obtenido de acuerdo con la metodología descrita por Harlow y Lane (1988). Para generarlo se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c inmunizadas con 20 μg en un volumen máximo de 300 μL de la proteína recombinante de interés purificada y con 2 diálisis consecutivas en 500 mL de amortiguador PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , and 2 mM KH_2PO_4). Para la inyección de la proteína se preparó en condiciones estériles una mezcla 1:1 con el adyudante de Freund incompleto. Fueron 2 inmunizaciones por vía intraperitoneal con una separación de 15 días entre cada una de ellas y se esperaron 15 días más para hacer el sangrado. Se dejó reposar la sangre por 4 horas a 37°C y después se incubó toda la noche a 4°C . Posteriormente para recuperar el sobrenadante, se centrifugó a $1\ 431 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Para almacenar en el congelador se agregó 30 % (v/v) de glicerol.

Western blot

Para la inmunodetección de las proteínas DctR y DctP se utilizó el suero con los anticuerpos policlonales respectivos. A partir de alícuotas de 1.5 mL de cultivo a la DO_{600nm} indicada para cada experimento, se obtuvieron las células por centrifugación a $12\ 879 \times g$ por dos minutos. La pastilla celular fue resuspendida en un amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 % SDS, 1 % β -mercaptoetanol) y la mezcla fue sonicada tres veces con una sonda de ultrasonidos durante 10 segundos con intervalos de descanso entre cada evento. Se cuantificó la concentración de proteína de los extractos totales de las cepas por el método de Bradford y en cada pozo del gel de electroforesis se cargó la misma concentración de las muestras. Las proteínas se separaron con electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Después de la electroforesis, el gel sin teñir se usó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de $0.45 \mu m$ (Amersham, UK) en amortiguador de transferencia a pH 9.0 (3 mM Na_2CO_3 , 10 mM $NaHCO_3$ y 20 % MeOH) durante una hora a 250 mA. Posterior a este proceso, se bloqueó la membrana con 0.2 % de leche en polvo baja en grasa disuelta en amortiguador TBS-T (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.01 % Tween-20) por 12 horas con agitación constante. La membrana de nitrocelulosa se lavó tres veces con el amortiguador TBS-T. Después del último lavado, se agregó el anticuerpo primario (1:10 000 para anti-His_{6x}-DctP y 1:3 000 para anti-His_{6x}-DctR), se incubó por una hora con agitación constante y se lavó tres veces más. Posteriormente, se agregó anticuerpo secundario (anti IgG de ratón conjugado con una fosfatasa alcalina; Sigma- Aldrich) diluido en amortiguador TBS-T en una relación 1: 30,000 y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante durante una hora. Terminada la incubación se lavó tres veces la membrana con el amortiguador TBS-T. Finalmente, a la membrana se le agregó el sustrato quimioluminisciente CDP-Star (Applied Bio-systems), se incubó la reacción por cinco minutos y se visualizó por autoradiografía en una placa Kodak.

Análisis bioinformático

- La búsqueda de homólogos de genes que codifican para transportadores de C4-DCB en el genoma de *R. sphaeroides* fue realizada en el servidor eggno-mapper (Huerta-Cepas *et al.*, 2017, 2019) (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/emapper>) que permite hacer asignaciones rápidas de ortología. También se hizo la búsqueda en PROTEIN DATA BANK (Berman *et al.*, 2000) (<http://www.wwpdb.org/>) y en el servidor Membrane Transport (Elbourne *et al.*, 2017) (www.membranetransport.org). Posteriormente, las secuencias se compararon usando la herramienta BLAST T (Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul *et al.*, 1997).
- Para la identificación de dominios y residuos conservados se usó Conserved Domain Database (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) e INTERPRO (Blum *et al.*, 2021) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).
- La predicción del péptido señal y la topología transmembranal de la secuencia de aminoácidos de las proteínas fue hecha en PHOBIUS (Käll *et al.*, 2007) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>).
- La predicción de cruces transmembranales fue hecha en TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y TMPRED (Ikeda *et al.*, 2003) (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html).
- La predicción de la estructura terciaria del dominio periplásmico de la cinasa de histidina DctS fue realizada en el servidor I-Tasser (Iterative Threading Assembly Refinement; Roy *et al.*, 2010) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).
- La predicción de ligandos y la identificación del sitio activo fue hecha en CATH (Sillitoe *et al.*, 2021) (<http://www.cathdb.info/>).
- La búsqueda de la región intercistronica *dctS-dctP* fue hecha en Gene Context Tool Ng (Martinez-Guerrero *et al.*, 2008) (<http://biocomputo.ibt.unam.mx:8080/GeConT/>).
- La detección del posible sitio de unión de DctR fue hecha en MEME (Bailey *et al.*, 2009) (<https://meme-suite.org/meme/>) con el comando “meme regiones_5UTR_de_dctP_-_110521.txt -dna -oc . -nostatus -time 14400 -mod zoops -nmotifs 1 -minw 6 -maxw 20 -objfun classic -revcomp -markov_order 0”. Analisis del posible regulón RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools; Thomas-Chollier *et al.*, 2008; Turatsinze *et al.*, 2008) (http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/genome-scale-dna-pattern_form.cgi).

-
- La revisión de inicios de la transcripción fue consultada en el trabajo de Henry y colaboradores (2020).
 - Los alineamientos múltiples fueron hechos en MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log- Expectation; Edgar, 2004) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1997) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o en T-COFFEE (Brimacombe *et al.*, 2015) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>).

Resultados

Homólogos de transportadores de C4-DCB en *R. sphaeroides*

La búsqueda de homólogos de sistemas transportadores de C4-DCB en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N y 2. 4. 1 se hizo en el servidor eggnog-mapper (Huerta-Cepas *et al.*, 2017, 2019) y en la base de datos de transportadores membranales (Elbourne *et al.*, 2017). La comparación de secuencias de proteínas conocidas fue hecha usando la herramienta BLASTP ($e\text{-value} = e^{-30}$, identidad= 30 %) (Altschul *et al.*, 1997). Para determinar la ortología se usó un criterio bidireccional del mejor candidato (Bidirectional best hit; BBH). Los alineamientos múltiples se realizaron con los parámetros asignados automáticamente en la versión en línea de MUSCLE (Edgar, 2004) y fueron visualizados en el software libre GeneDoc (Version 2, June 1991).

Con estos análisis no fue posible detectar homólogos para DctA u otras proteínas transportadoras de la familia DcuA/B o CitT. Usando el servidor eggNOG, solo se identificó con el 38 % de identidad a un ortólogo de la familia de transportadores DauA, codificado en el gen RSP_0580 en 2.4.1 (RSWS8N_08230 de WS8), anotada como una sulfato permeasa putativa perteneciente al grupo de los transportadores de sulfato (91 % de cobertura, $e\text{-v} 3e^{-94}$ y 39.02 % de identidad con *dauA* de *E. coli*) (Tabla 10).

En el año 2008, Arai y colaboradores (2008) publicaron el perfil transcriptómico de *R. sphaeroides* 2.4.1 durante la transición entre el crecimiento fotoheterotrófico y el heterotrófico en medio mínimo Sistro. De acuerdo con estos datos, el nivel de transcripción del gen RSP_0580 es muy bajo en crecimiento fotoheterotrófico y casi nulo en crecimiento heterotrófico, lo que podría indicar que no representa un transportador de C4-DCB activo, al menos no en estas condiciones de crecimiento (Figura 10).

En la base de datos Membrane Transport (www.membranetransport.org) se identificaron en *R. sphaeroides* 2. 4. 1 los genes RSP_0656 y RSP_3330 cuyos productos pertenecen a la familia DASS, con un mecanismo simporte sodio/sulfato putativo. También se encontraron cinco genes cuyos productos son parte de la familia TTT: RSP_1418 (TctA), RSP_1419 (TctB), RSP_1420 (TctC), RSP_3386 (TctC), RSP_3387 (TctA) y RSP_3409 (TctA). Se ha reportado

que homólogos de estos genes en *Corynebacterium glutamicum* (Brocker *et al.*, 2009) y en *Salmonella typhimurium* (Widenhorn *et al.*, 1989) están involucrados en el transporte de citrato. De acuerdo con el trabajo de Arai (2008), el operón RSP_1418- RSP_1420 (*tctCBA*) es el único que se expresa de este conjunto de genes y solo durante el crecimiento heterotrófico. De la familia de transportadores tipo TRAP se encontraron 35 genes que codifican para las diferentes subunidades de estos transportadores, lo que hace una suma total de 12 diferentes transportadores de esta familia.

Tabla 10. Homólogos de familias de transportadores de C4-DCB en <i>R. sphaeroides</i>	
Familia	Homólogos en <i>R. sphaeroides</i> 2. 4. 1
DASS	RSP_0656 RSP_3330
TGDS	RSP_0580 (39 % e identidad con DauA de <i>E. coli</i>) SulP (putativo)
TTT	RSP_1418 (TctA) RSP_1419 (TctB) RSP_1420 (TctC) RSP_3386 (TctC) RSP_3387 (TctA) RSP_3409 (TctA)
TRAP	35 (Ver tabla 11)

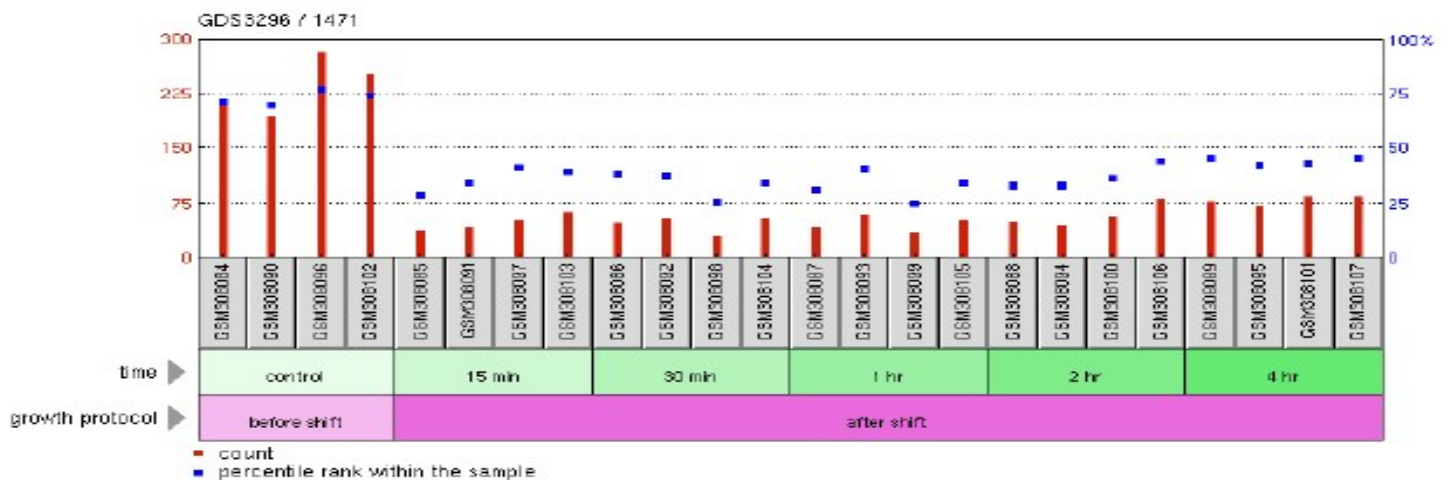


Figura 10 Perfil transcripcional de la sulfato permeasa (RSP_0580) de la familia de transportadores TGDS (DauA). Cada barra representa uno de los 4 ensayos independientes hechos en cada uno de los tiempos indicados (Arai *et al.*, 2008).

Los transportadores tipo TRAP en *R. sphaeroides*

Con respecto a la familia de transportadores tipo TRAP, se encontró que está ampliamente representada en el genoma de *R. sphaeroides*, aunque el número de genes que codifican para proteínas de esta familia varía dependiendo de la cepa que se analice (puede ir de 35 en la cepa 2. 4. 1 hasta 49 genes en la cepa KD131). En la cepa WS8N se encontraron 35 genes que codifican para las diferentes subunidades de transportadores tipo TRAP, los cuales están agrupados en 12 operones y por ende existirían 12 posibles sistemas transportadores TRAP en esta cepa. Se predice, de acuerdo con los alineamientos en BLAST, que están asociados con el transporte de compuestos como taurina, ácido alfa-cetoglutarato y sorbitol/manitol. En el contexto génico inmediato de cuatro de estos operones se encuentran genes que codifican para elementos regulatorios: el operón RSWS8N_13470-80 está contiguo al gen RSWS8N_13490 que codifica para un regulador transcripcional de la familia GntR; el operón RSWS8N_13520-30 donde están codificadas la proteína de unión a ligando de la familia TRAP-TAXI y las subunidades membranales Q y M de un presunto sistema transportador de glutamato, adyacentemente está el operón RSWS8N_13510-15 donde están codificadas las proteínas de un sistema de dos componentes homólogas a las proteínas DctBD de *Pseudomonas aeruginosa* (39.5 % de identidad con DctB y 52 % de identidad con DctD). El operón bicistrónico formado por el gen RSWS8N_16034 codifica para un homólogo de DctP (21 % de identidad) y el producto del gen RSWS8N_16029 es la fusión de las subunidades de membrana QM, y río arriba de este operón se encuentra el gen RSWS8N_16039 cuyo producto es un regulador transcripcional de la familia MurR/ RpiR (Tabla 11).

Tabla 11. Homólogos de transportadores tipo TRAP en *R. sphaeroides* 2. 4. 1 y WS8N

Subunidad	2. 4. 1	WS8N	% identidad entre 2.4.1 y WS8N	% identidad con DctPQM (WS8N)	Anotación	Contexto génico en el que se encuentran las subunidades
Cromosoma I						
P	RSP_0910	RSWS8N_09985	100	100	Subunidad periplásmica (SBP) de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	Río arriba se encuentran RSWS8N_09975-09980 que codifican para el sistema de dos componentes DctSR
Q	RSP_0911	RSWS8N_09990	100	100	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	
M	RSP_0912	RSWS8N_09995	99	100	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	
P	RSP_0487	RSWS8N_07745	99	29	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	Río arriba se encuentra RSWS8N_07750 uxaC (glucoronato isomerasa)
Q	RSP_0485	RSWS8N_07740	93	18	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	
M	RSP_0484	RSWS8N_07735	100	33	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de C4-DCB	
P	RSP_0636	RSWS8N_08575	99	23	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP	Río arriba: RSWS8N_8585 Glycina/D-aminoácido oxidasa, y río abajo: RSWS8N_8590 hidantoinasa B/acetona carboxilasa, subunidad alfa
Q	RSP_0635	RSWS8N_08570	95	18	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP	
M	RSP_0634	RSWS8N_08565	99	30	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP	
P	RSP_1605	RSWS8N_13480	99	27	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP de α -cetoglutarato (TakP)	Río arriba: RSWS8N_13485 y 13490 codifican para un regulador transcripcional de la familia GntR. Río abajo: RSWS8N_13465 metiltransferasa dependiente de SAM
Q	RSP_1604	RSWS8N_13475	98	19	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de α -cetoglutarato	
M	RSP_1602	RSWS8N_13470	99	31	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de α -cetoglutarato	

Tabla 11. Continuación...

Subunidad	2. 4. 1	WS8N	% identidad entre 2.4.1 y WS8N	% identidad con DctPQM (WS8N)	Anotación	Contexto génico
P	RSP_2320	RSWS8N_01885	100	23	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	Río arriba: RSWS8N_01900 y 019905, N-formilglutamato aminohidrolasa, y regulador transcripcional de la familia RipR,
Q	RSP_2322	RSWS8N_01890	100	18	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	respectivamente. Río abajo: RSWS8N_01880 glutamina sintetasa.
M	RSP_2321	RSWS8N_01895	100	26	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	
P	RSP_1613	RSWS8N_13520	99.9	22	Subunidad periplásmica de la familia TAXI de un transportador tipo TRAP	Río arriba: RSWS8N_13520 y 13515, sistema de dos componentes DctBD
QM	RSP_1614	RSWS8N_13525	99.3	n/i	Fusión de las subunidades membranales de un transportador tipo TRAP	
P	n/i	RSWS8N_05700	---	23	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	Río arriba: RSWS8N_t15155 un tRNA y
Q	n/i	RSWS8N_05710	---	22	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	Río abajo: RSWS8N_05715 (NADH:ubiquinona oxidoreductasa subunidad 3)
M	RSP_6094	RSWS8N_05705	99	20	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	
Cromosoma II						
P	RSP_3661	RSWS8N_15284	99	33	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP	Río arriba, RSWS8N_15299 regulador transcripcional de la familia GntR
Q	RSP_3663	RSWS8N_15294	99.46	29.46	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP	Río abajo: RSWS8N_15279 amidohidrolasa
M	RSP_3662	RSWS8N_15289	100	35	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP	

Tabla 11. Continuación...

Subunidad	2. 4. 1	WS8N	% identidad entre 2.4.1 y WS8N	% identidad con DctPQM (WS8N)	Anotación	Contexto génico
P	RSP_3453	RSWS8N_18739	100	24	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP	Río arriba: RSWS8N_18744 proteína de la familia LamB/YcsF. Río abajo: RSWS8N_18724 Alofanato hidrolasa subunidad 1
Q	RSP_3452	RSWS8N_18734	98	17	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP	
M	RSP_3451	RSWS8N_18729	99.54	30	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP	
P	RSP_3372	RSWS8N_18339	99	19	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	Río abajo de la subunidad membranal grande: RSWS8N_18324, tRNA aminotransferasa. Río arriba: componente membranal de un transportador ABC
Q	RSP_3371	RSWS8N_18334	99.47	19	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	
M	RSP_3370	RSWS8N_18329	99	26	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP de manitol/compuestos cloroaromáticos	
P	RSP_1412	RSWS8N_16034	99	21	Subunidad periplásmica de la familia TAXI de un transportador tipo TRAP	Río arriba: RSWS8N_16039 regulador transcripcional de la familia MurR/RipR.
QM	n/i	RSWS8N_16029	n/i	---	Fusión de las subunidades membranales de un transportador tipo TRAP	Río abajo: RSWS8N proteína universal de estrés UspA.
Plásmido B						
P	RSP_4016	RSWS8N_RS20127	99.7	27	Subunidad periplásmica de un transportador tipo TRAP	RSWS8N_RS20115 oxidoreductasa que une FAD
Q	RSP_4015	RSWS8N_RS20130	100	30	Subunidad membranal pequeña de un transportador tipo TRAP	
M	RSP_4014	RSWS8N_RS20125	99.55	35	Subunidad membranal grande de un transportador tipo TRAP	
n/i no identificado						

Es importante resaltar que en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N se encontraron los genes RSWS8N_09985, RSWS8N_09990 y RSWS8N_09995 cuyos productos son las proteínas estructurales del sistema transportador de ácidos C4-dicarboxílicos DctPQM (RSP_0910, RSP_0911 y RSP_0912, respectivamente, en *R. sphaeroides* 2.4.1), homólogas al principal sistema transportador de estos compuestos en *R. capsulatus* (DctP 89.42 %; DctQ 77.09 % y DctM con 85.91 % de identidad de la secuencia de aminoácidos). Conservando la misma sintenia que en *R. capsulatus*, se localizan los genes RSWS8N_09980 y RSWS8N_09975 que codifican para las proteínas del sistema de dos componentes DctSR (con 58 % y 62 % de identidad de la secuencia de aminoácidos, respectivamente (ver Figura 9).

Características del sistema DctPQM y DctSR de *R. sphaeroides*

Características de DctP

El gen RSWS8N_09985 de 1005 pb codifica para la proteína DctP de 335 aminoácidos de los cuales los primeros 26 corresponden al péptido señal que permite que esta proteína sea dirigida al periplasma. El punto isoeléctrico de esta proteína de unión a ligando es de 4.71. En un alineamiento con otras proteínas de unión a ligando (datos no mostrados) se identificó que conservan los residuos del sitio activo descritos por cristalografía para otras SBP (R172, Q174, F195, N212, P213, N216 y L237) (Felder *et al.*, 1999; Tam & Saier, 1993).

Características de DctQ

El gen RSWS8N_09990 de 684 pb codifica para la proteína integral de membrana DctQ de 227 aminoácidos, tiene 4 hélices transmembranales (12-34, 69-91, 112-134, 154-173; TMHMM) con sus extremos amino y carboxilo terminal orientados al interior celular (Figura 11). En su estructura no se predice ningún dominio conocido.

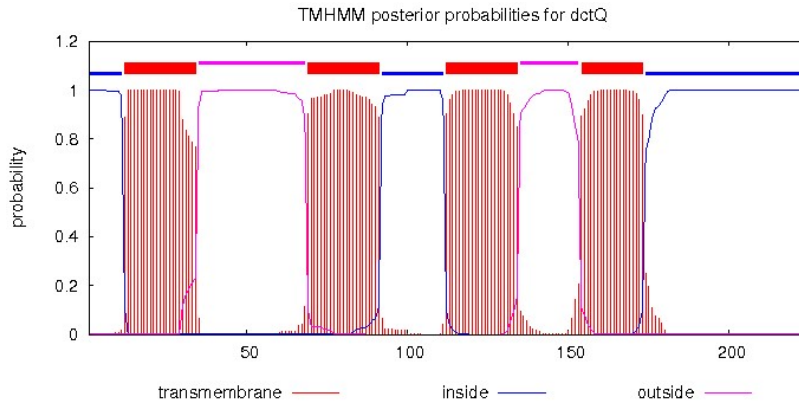


Figura 11. Predicción de las hélices transmembranales de DctQ (TMHMM).

Características de DctM

El gen RSWS8N_09995 de 1326 pb codifica para la subunidad DctM, una permeasa de 442 aminoácidos, con 12 hélices transmembranales (3-24, 54-75, 91-107, 113-130, 135-161, 184-204, 230-249, 254-270, 281-306, 324-341, 369-390 y 410-428) con ambos extremos N y C terminal orientados al citoplasma. Se conservan los dos pares de prolinas importantes para la formación del canal, descritos por Mulligan y colaboradores (2011).

Características de DctR

El producto del gen RSWS8N_09975 de 609 pb es la proteína DctR de 203 aminoácidos (21678.12 Da) con un punto isoeléctrico de 5.52. Se reconocen dos dominios, el primero es un dominio receptor similar al dominio REC de CheY que va del residuo 3 al 118 y el segundo dominio de unión a DNA de la familia LuxR que va del residuo 134 al 199.

De acuerdo con el servidor InterPro y con la predicción de dominios conservados se predice que el residuo D53 es el sitio de fosforilación. Los posibles residuos involucrados con la unión a DNA son: 142S, 143A, 144R, 157L, 158N, 159K, 167I, 168A, 170R, 171T, 173E, 174L, 175H, 176R, 177S, 188A (Figura 12).

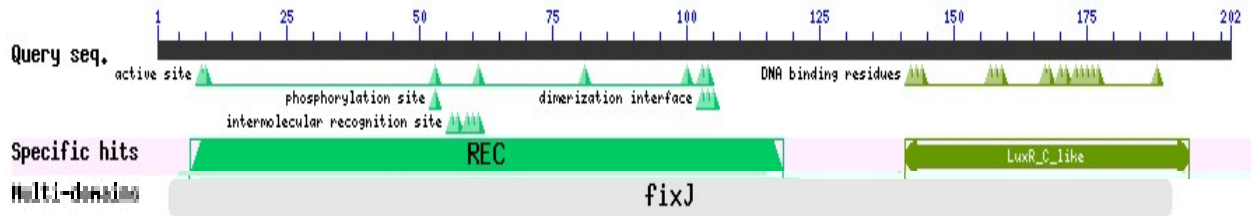


Figura 12. Predicción de los dominios conservados de la proteína DctR. REC, Dominio receptor de señal, LuxR_C_like. Dominio C-terminal de unión a DNA de proteínas tipo LuxR. CheY, Receptor tipo CheY. TtrR y fixJ, reguladores de respuesta (BLAST domain prediction).

Características de DctS

El producto del gen RSWS8N_09980 de 1986 pb es la cinasa de histidina DctS de 661 aminoácidos y cuyo punto isoeléctrico es de 6.48. En un análisis de dominios conservados se reconoce un dominio PAS citoplásmico que va del residuo 283 al 410 donde estaría coordinado un grupo hemo con los residuos 343M, 351I, 354T, 355L, 387V, 389E; el dominio fosfoceptor/ dimerización estaría comprendido de los residuos 432 al 502, siendo el sitio de fosforilación el residuo 444H; el dominio cinasa (HK) del residuo 497 al residuo 658. Se predice que es una cinasa de histidina funcional como homodímero. En el extremo N-terminal se encuentran las 2 HTM separadas por un segmento de 200 aminoácidos orientado hacia el periplasma y donde no se reconoce ningún dominio (Figura 13).

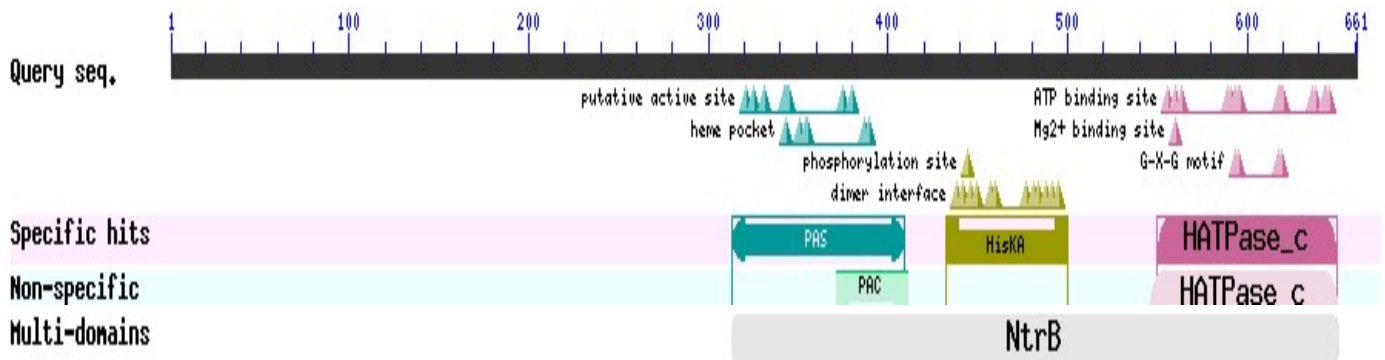
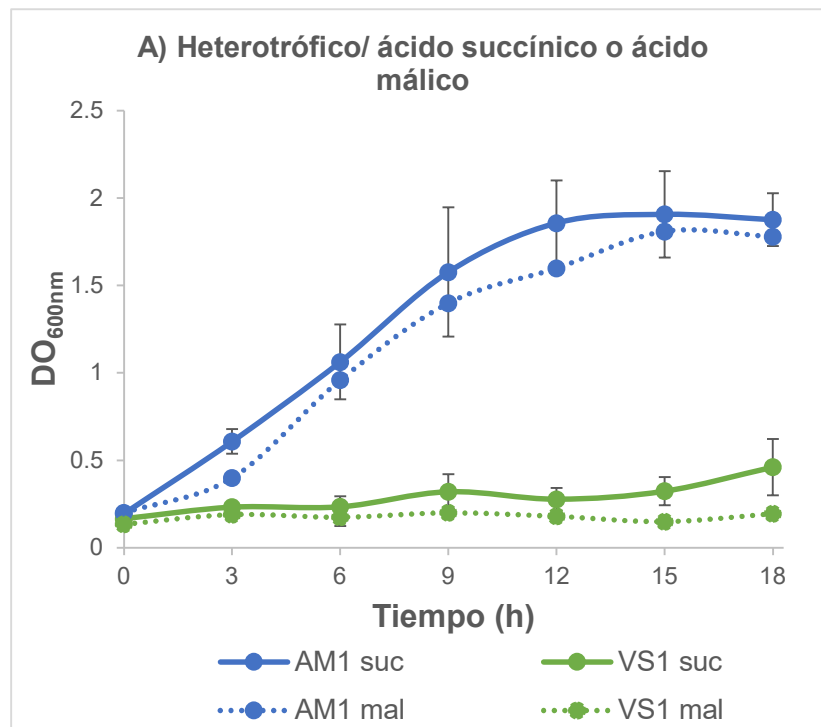


Figura 13. Predicción de los dominios conservados de la proteína DctS. HATPase_c. ATPasas tipo cinasas de histidina. PAS: Per-ARNT-Sim. PAC motivo C-terminal en los dominios PAS. HisKA: dominio fosfoceptor/dimerización de la cinasa de histidina A. NtrB cinasa de histidina específica para el nitrógeno.

DctPQM es el principal transportador de ácido succínico activo en *R. sphaeroides*

Con el objetivo de determinar si en *R. sphaeroides* el sistema DctPQM es el único transportador de ácidos C4-dicarboxílicos que soporta el crecimiento cuando estos compuestos constituyen la única fuente de carbono en el medio de cultivo, se aisló la cepa mutante VS1 en la que los genes *dctPQM* fueron reemplazados por un casete de resistencia a higromicina. Se evaluó el crecimiento de la cepa parental AM1 y de VS1 en condiciones heterotróficas (Figura 14 A) y fotoheterotróficas (Figura 14 B). Se encontró que en ninguna de estas condiciones VS1 crece usando al succinato como fuente de carbono, a diferencia de la cepa parental AM1, donde el tiempo de duplicación es de 4.2 ± 0.6 horas en crecimiento heterotrófico y de 4.7 ± 0.5 horas en crecimiento fotoheterotrófico. Se obtuvo el mismo resultado al usar malato como única fuente de carbono. Estos resultados sugieren que en estas condiciones de crecimiento DctPQM es el único sistema transportador de C4-DCB en *R. sphaeroides*.

Con otras fuentes de carbono como piruvato y casaminoácidos no hay diferencia significativa entre las curvas de crecimiento de las cepas comparadas (Figura 14 C). El tiempo de duplicación en heterotrofia con ácido pirúvico es de 3.6 ± 0.5 horas y de 5.2 ± 1.1 horas con 0.2 % de casaminoácidos.



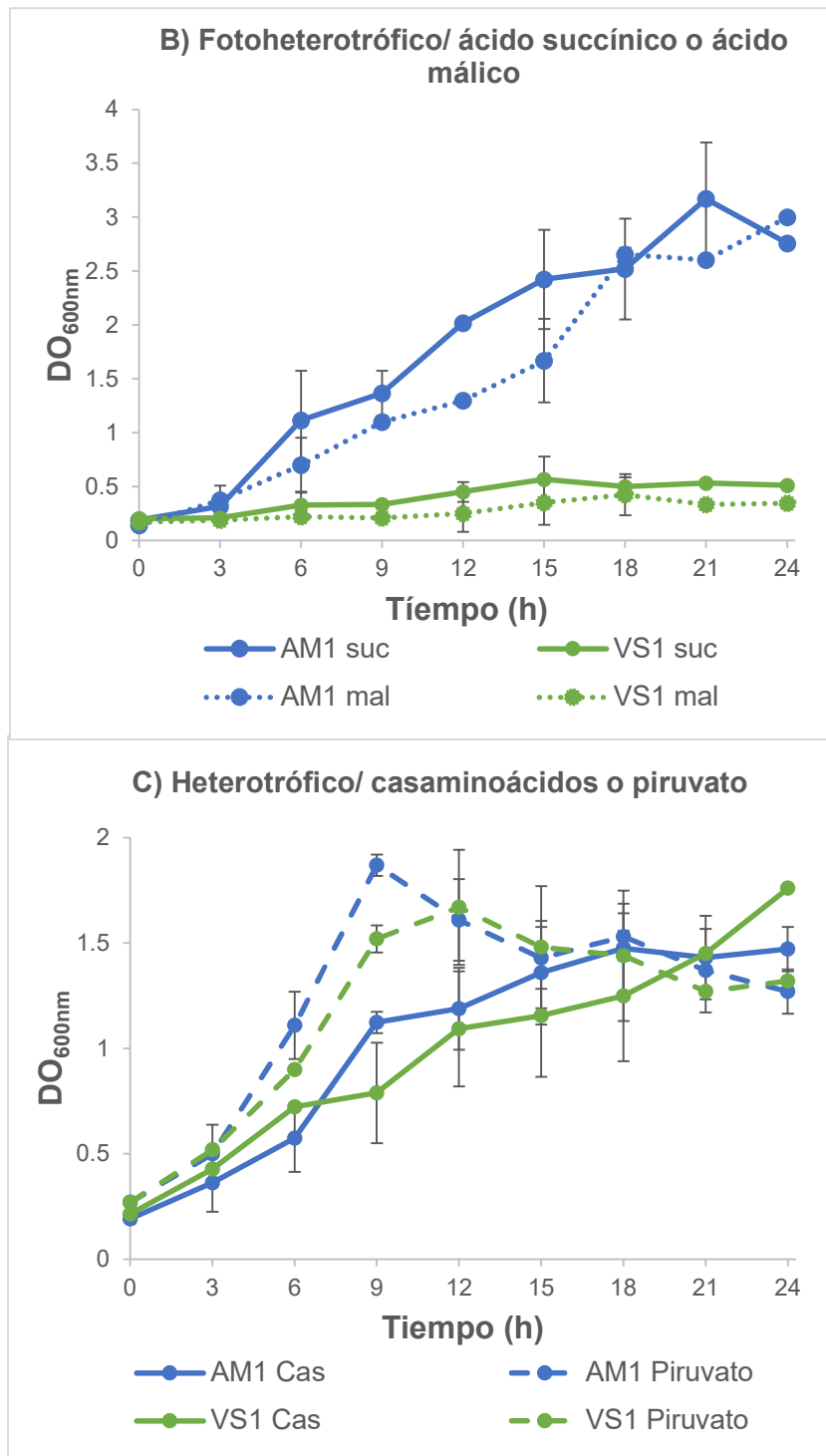


Figura 14. Curva de crecimiento de las cepas AM1 y VS1. En A) se muestra el crecimiento heterotrófico en medio mínimo Sistrom con 34 mM de ácido succínico (suc) o 34 mM de ácido málico (mal). En B) se muestra el crecimiento fotoheterotrófico con 34 mM de ácido succínico o 34 mM de ácido málico (mal). En C) se compara el crecimiento heterotrófico de AM1 y VS1 en medio mínimo Sistrom donde se sustituyó la fuente de carbono por 0.2 % de casaminoácidos (cas) o 20 mM de piruvato.

El crecimiento heterotrófico de *R. sphaeroides* en ácido succínico requiere de una alta expresión del sistema transportador DctPQM

Para complementar a la mutante VS1 ($\Delta dctPQM::hyg$) se construyeron 2 plásmidos: en el primero de ellos, pRK415, de bajo número de copias (entre 4 y 7) (Inui *et al.*, 2003) se insertó la copia silvestre de los genes *dctPQM* bajo el control del promotor *lac*. Por otro lado, se insertó la copia silvestre de los genes *dctPQM* bajo el control del promotor sintético pA1/04/03 inducible con IPTG del plásmido pINDGm, el cual es un vector de mediano número de copias (entre 14 y 17) (Ind *et al.*, 2009). Se corroboró la expresión del gen *dctP* desde ambos vectores a través de la inmunodetección de DctP y se observó que el nivel de expresión de esta proteína se corresponde con la fuerza del promotor y el número de copias de los plásmidos (Figura 15).

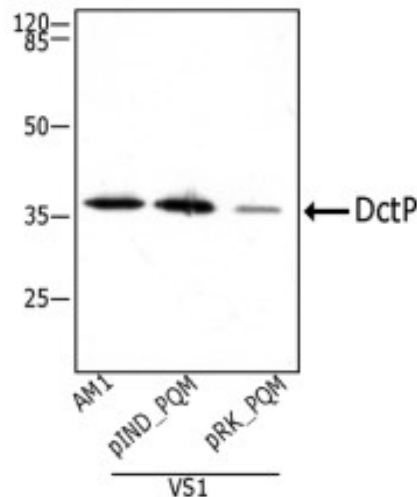


Figura 15. Inmunodetección de DctP en extractos totales de células creciendo heterotróficamente usando al ácido succínico como fuente de carbono. De lado izquierdo se muestra la migración del marcador de peso molecular.

La expresión de los genes *dctPQM* desde el promotor *lac* del plásmido pRK415, no fue suficiente para restaurar el crecimiento heterotrófico ni fotoheterotrófico de VS1 en un medio con succínico como fuente de carbono (Figura 16 paneles A y B). Al expresar estos genes desde el promotor del plásmido pINDGm en presencia de IPTG se obtuvo el nivel de expresión adecuado para que la mutante VS1 pudiera recuperar la capacidad de crecer heterotróficamente con dicho C4-DCB (Figura 16 panel A). Además, en la figura 16 A, se puede observar que a pesar de que la cepa AM1 pINDGm_*dctPQM* expresa los genes

dctPQM desde el cromosoma y desde el plásmido pINDGm no presenta un incremento en la densidad celular, lo que sugiere que en estas condiciones la disponibilidad de C4-DCB no fue el factor limitante para entrar a la fase estacionaria.

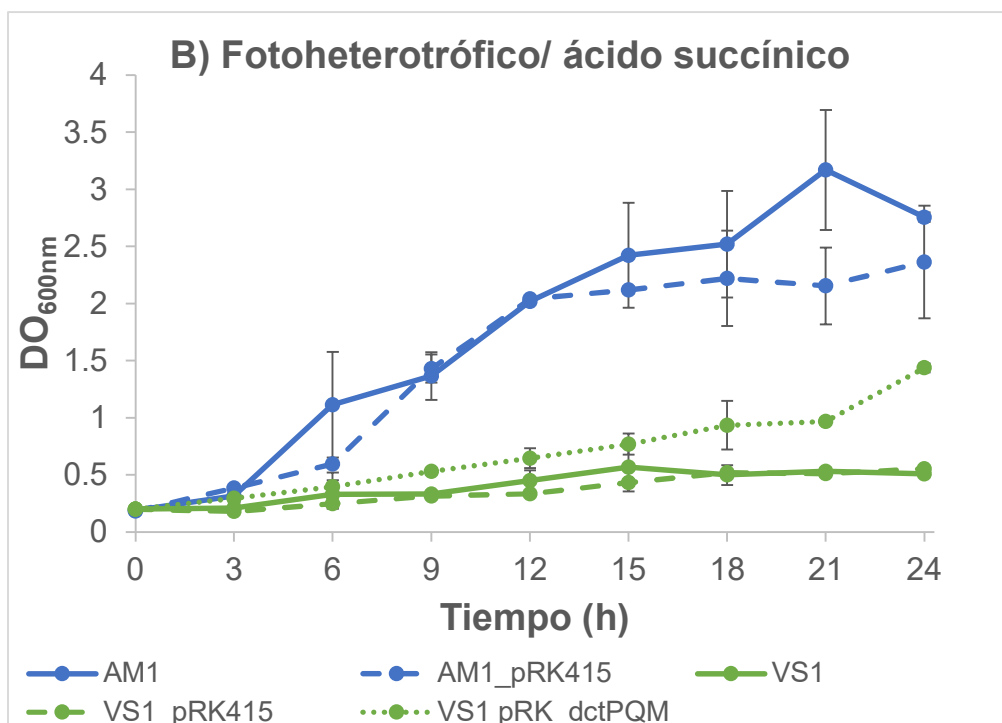
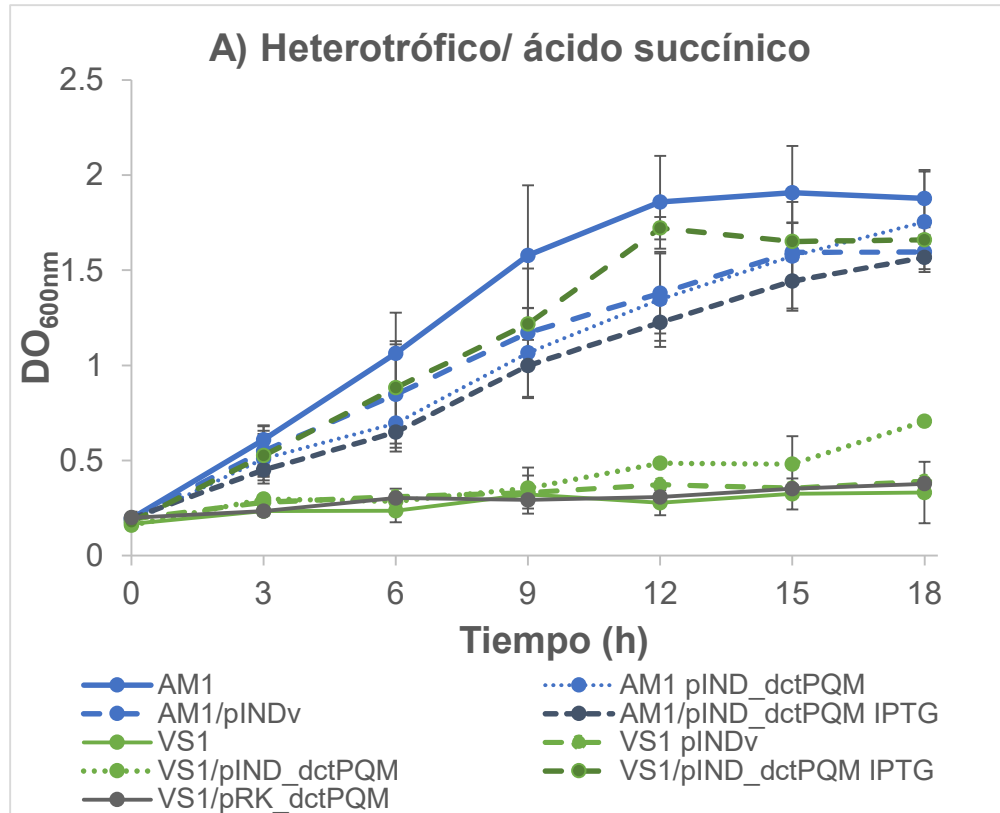


Figura 16. Crecimiento de las cepas AM1 y VS1 en condiciones heterotróficas con los plásmidos pRK415, pRK_dctPQM, pIND vacío (pINDv) y con el plásmido pIND_dctPQM sin o con 1 mM de IPTG (A) y en B) se muestra el crecimiento en condiciones fotoheterotróficas con los plásmidos pRK415 y pRK_dctPQM.

El incremento en la expresión de DctPQM limita el crecimiento fotosintético

Por otro lado, al monitorear el crecimiento fotoheterotrófico de las cepas AM1 y VS1 (Figura 17), se observó que la cepa VS1 logró recuperar su capacidad de crecer fotoheterotróficamente en ácido succínico como única fuente de carbono al expresar los genes *dctPQM* desde el promotor del pIND aún en ausencia del inductor IPTG (Figura 17 panel B, flecha azul). Esto se debe a que en este vector se presenta una transcripción fuga, que escapa a la represión de LacI, ya reportada (Ind *et al.*, 2009) y corroborada por inmunodetección de DctP en este fondo génico (Anexo 2). Se observó que la cepa parental AM1 pIND_dctPQM, que expresa los genes del transportador desde el cromosoma y desde el plásmido, no crece (Figura 17 panel A, flecha azul). Al agregar el inductor IPTG el crecimiento fotoheterotrófico de AM1 pIND_dctPQM y de VS1 pIND_dctPQM se limita (Figura 17 paneles A y B, flechas rojas). Debido a que AM1 pINDv no presenta ninguna restricción en su crecimiento fotoheterotrófico y a que la cepa VS1 pINDGm_dctPQM crece mejor en ausencia del inductor IPTG, se sugiere que durante el crecimiento fotoheterotrófico, un alto nivel de expresión de los genes *dctPQM* puede resultar en un exceso de ácido succínico en el interior celular lo que podría estar saturando los complejos respiratorios al ser usado como fuente de carbono y donador de electrones. El DMSO funciona como aceptor de electrones alternativo para disipar el excedente de equivalentes reducidos de la poza de quinonas (Gordon & McKinlay, 2014; Richardson *et al.*, 1988; Spero *et al.*, 2016; Tichi *et al.*, 2001; Tichi & Tabita, 2000), por ello, al adicionar DMSO se restauró el crecimiento fotoheterotrófico en el medio con ácido succínico como única fuente de carbono, sugiriendo que un exceso de DctPQM es perjudicial para mantener el balance redox en el metabolismo fotoheterotrófico de *R. sphaeroides* (Figura 17 paneles A y B flechas verdes).

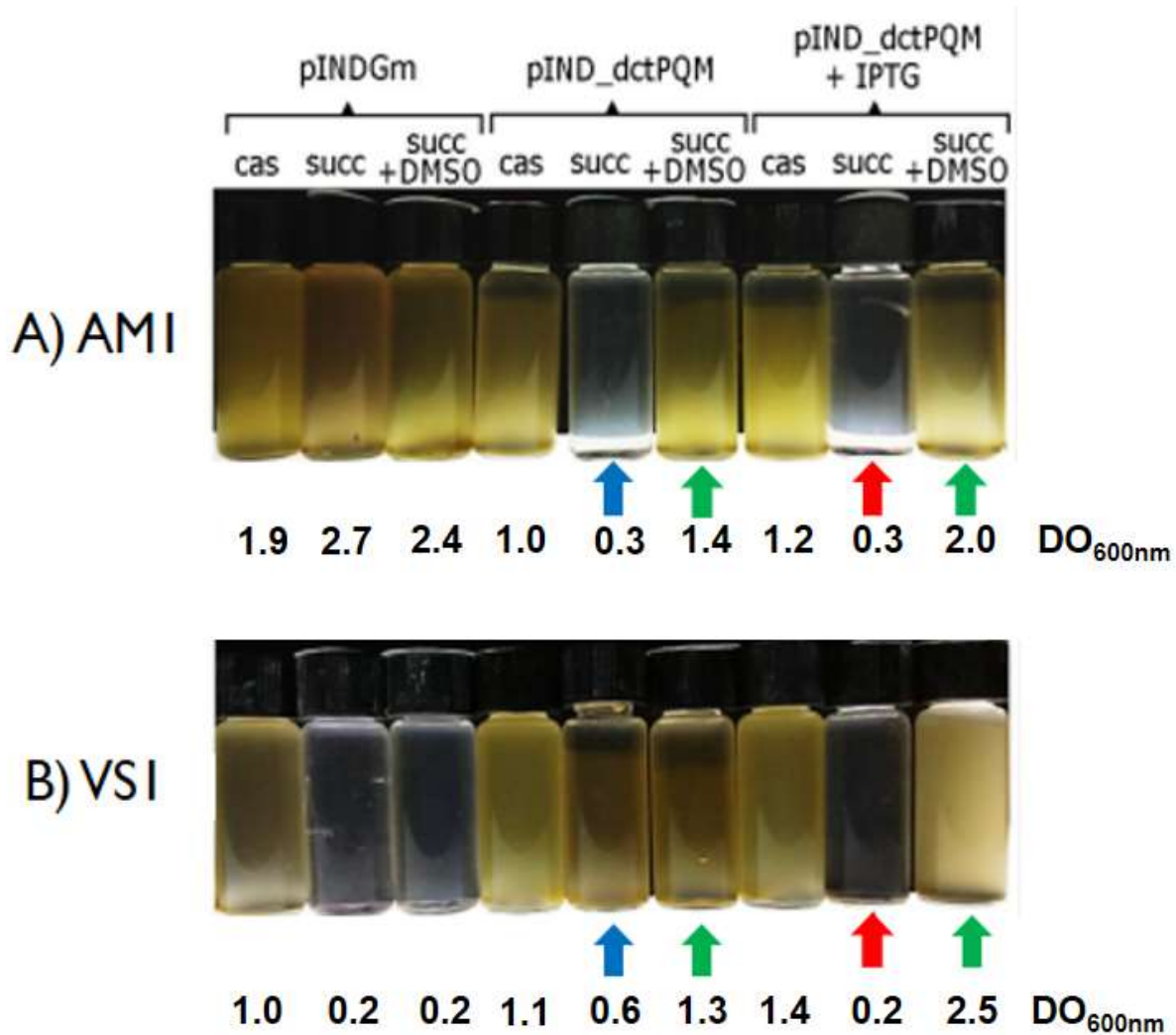
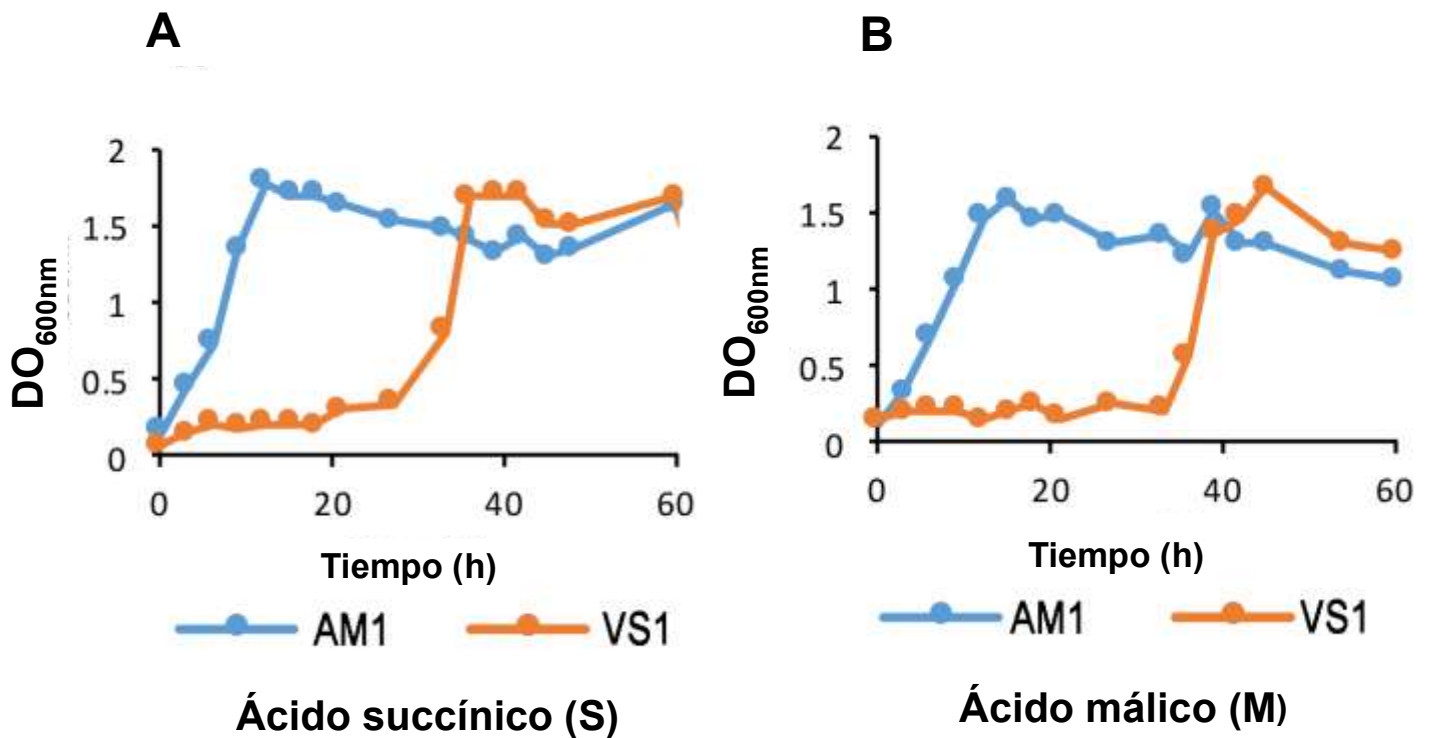


Figura 17. Crecimiento fotoheterotrófico de AM1 (A) y VS1 (B) con el plásmido pIND vacío o con el plásmido pIND_dctPQM sin o con 1 mM de IPTG. Como fuente de carbono se adicionaron casaminoácidos o ácido succínico o ácido succínico más DMSO. Con las flechas azules se indica el crecimiento con ácido succínico de estas cepas con el plásmido pIND_dctPQM en ausencia del inductor, nótese la diferencia entre ambas cepas. Con las flechas rojas se observa el nulo crecimiento de AM1 y VS1, ambas con el plásmido pIND_dctPQM en presencia del inductor IPTG, en verde se resalta el restablecimiento de la capacidad de crecer en MMS con ácido succínico debido a la adición de 16 mM de DMSO. Se muestra también la DO_{600nm} final de cada uno de los viales. Solo para tomar la fotografía los viales fueron colocados con un fondo negro.

En ausencia de DctPQM es posible obtener mutantes supresoras secundarias que restauran el crecimiento en MMS con C4-DCB

La evidencia indica que en *R. sphaeroides* el sistema DctPQM es un transportador de C4-DCB esencial tanto para el crecimiento heterotrófico como para el fotoheterotrófico. Sin embargo, fue posible obtener mutantes supresoras ya que en ausencia de este sistema transportador (cepa VS1), los cultivos heterotróficos después de aproximadamente 30 horas de incubación comenzaron a crecer exponencialmente hasta alcanzar la fase estacionaria en un medio cuya fuente de carbono era solo ácido succínico o ácido málico (Figura 18 A y B, respectivamente). Se tomaron muestras de estos cultivos y se reinocularon en MMS con ácido succínico o ácido málico como fuentes de carbono, observando que estos subcultivos presentan una curva de crecimiento comparable a la de la cepa parental AM1 independientemente del ácido C4-dicarboxílico usado (Figura 18 C).



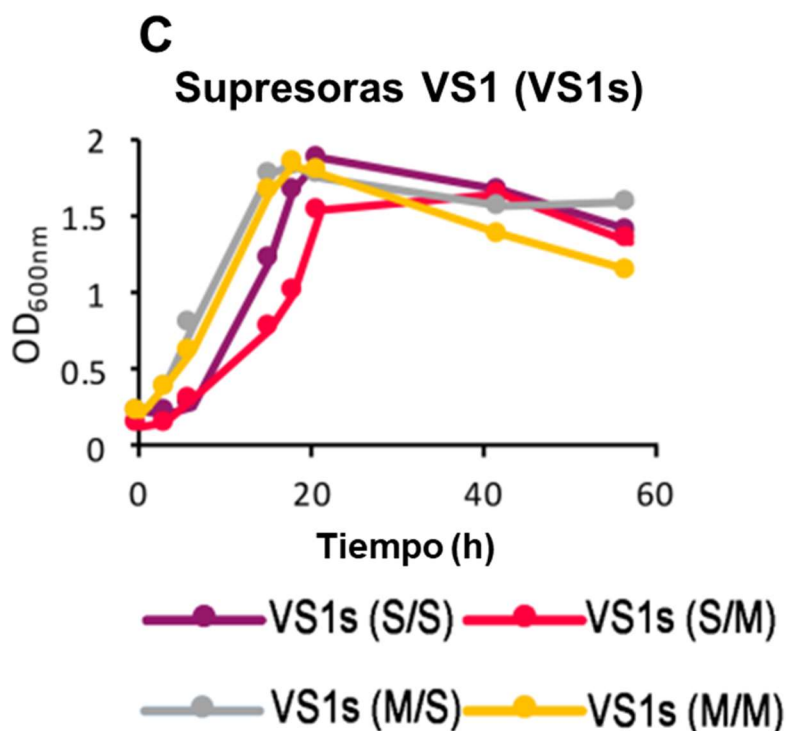


Figura 18. Curvas registradas hasta las 60 horas de crecimiento heterotrófico de AM1 y VS1 en MMS con ácido succínico (panel A) o ácido málico (panel B). Se muestra un incremento exponencial en la OD_{600nm} de la cepa VS1 ($\Delta dctPQM$) después de 30 horas de incubación. Subcultivos de las células supresoras (s) obtenidas en la fase estacionaria de cultivos provenientes de MMS con ácido succínico (S) o con ácido málico (M) fueron reinoculados en MMS con ácido succínico o con ácido málico y se monitoreó su crecimiento (Panel C).

El papel del sistema DctSR en la regulación de la expresión de *dctPQM*

Tomando en cuenta los antecedentes del sistema Dct en *R. capsulatus*, donde el sistema de dos componentes DctSR controla la expresión del operón *dctPQM* (Hamblin *et al.*, 1993), se exploró en *R. sphaeroides* el papel del homólogo del regulador de respuesta DctR y de la cinasa de histidina DctS en la expresión de los genes que codifican para las proteínas del transportador DctPQM. Con este objetivo, se aislaron las mutantes VS2 ($\Delta dctR::hyg$) y VS3 ($\Delta dctS::hyg$).

Se verificó por Western blot la presencia o ausencia de DctR en las cepas AM1, VS2, VS2 pRK_dctR y VS3 (Figura 19 panel A). Dado que los genes *dctS* y *dctR* forman un operón y quizá estén acoplados traduccionalmente (Figura 19 panel B) la mutación en el gen *dctS* afectó negativamente la expresión del gen *dctR*, por lo que las características observadas en la cepa VS3 son derivadas de la ausencia de ambos elementos del sistema de dos componentes.

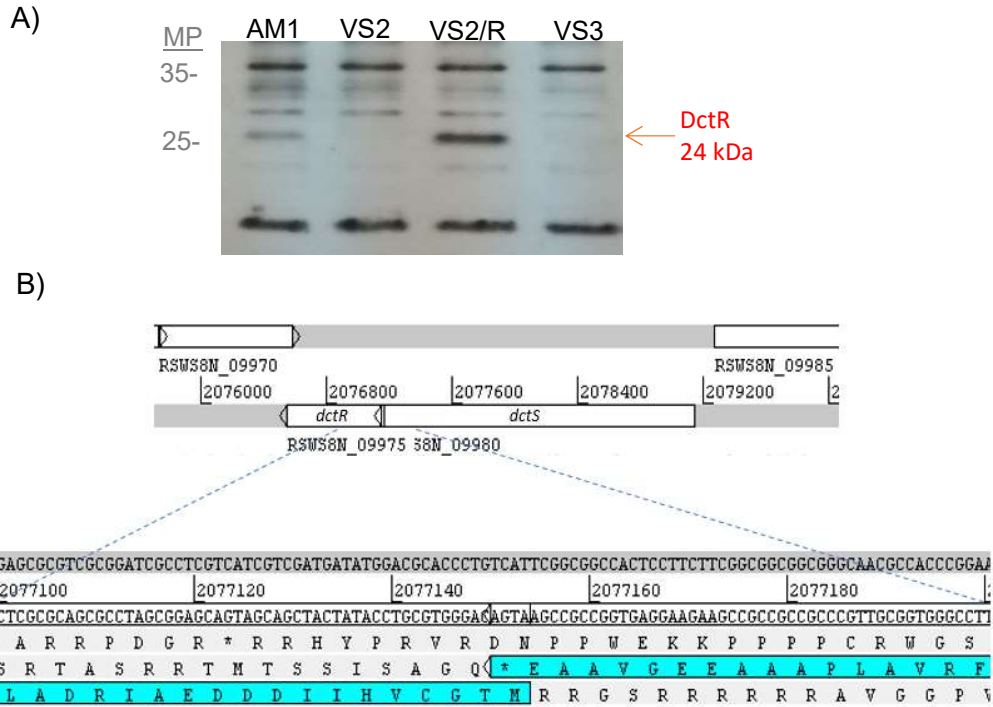
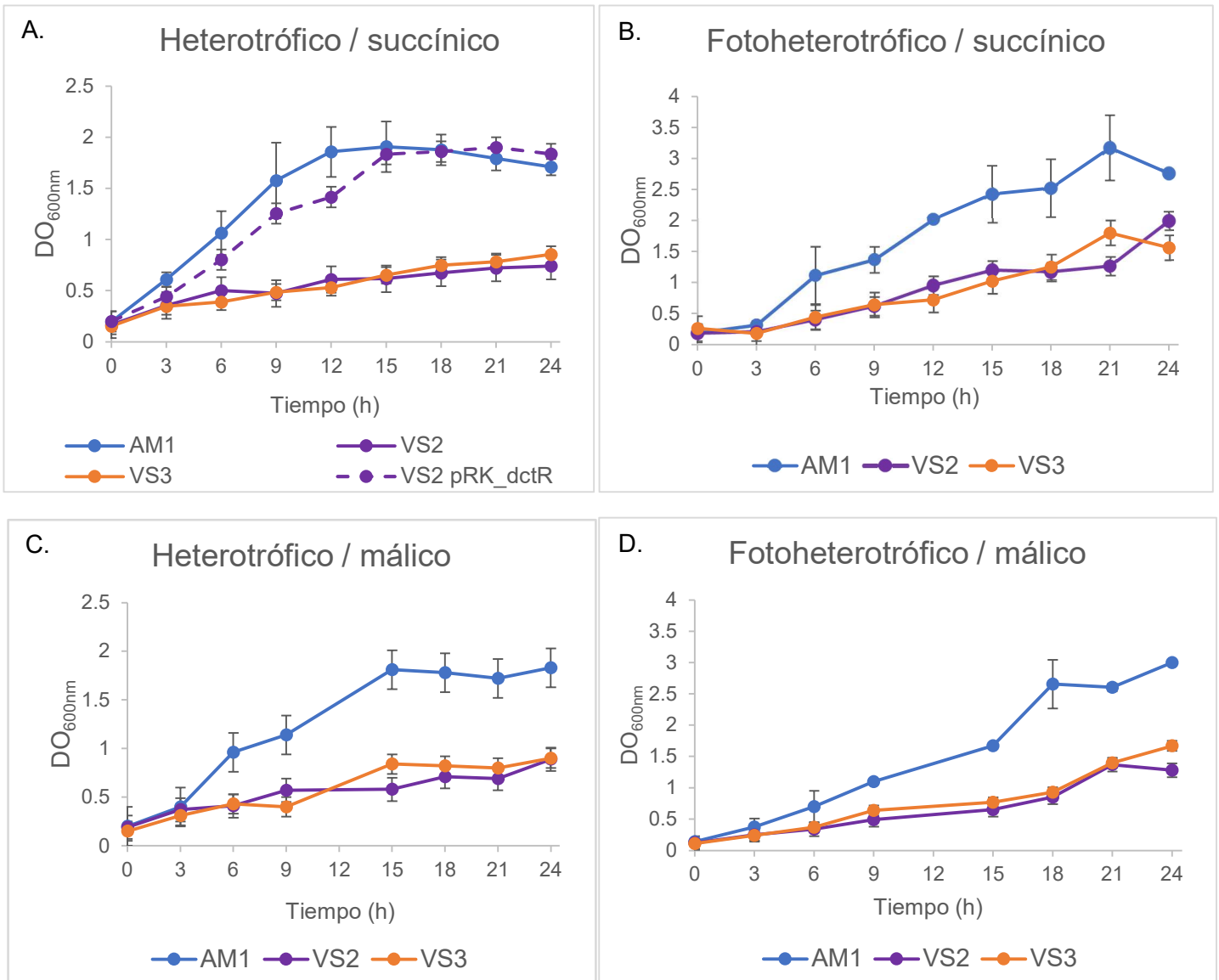


Figura 19. En A) Inmunodetección de DctR en extractos totales de células creciendo heterotróficamente con ácido succínico como fuente de carbono. B) se muestra el traslape de los genes *dctS* y *dctR*.

La ausencia de DctR y de DctS provoca una disminución del crecimiento en MMS suplementado con C4-DCB

Se evaluó la capacidad de VS2 y VS3 para crecer heterotrófica y fotoheterotróficamente usando diferentes fuentes de carbono. En ambas condiciones las mutantes crecen 3 veces más lento que la cepa parental AM1 cuando los ácidos C4-DCB son las únicas fuentes de carbono adicionadas al medio de cultivo: mientras que para AM1 el tiempo de duplicación es de 4.2 ± 1.1 horas, para VS2 es de 12.9 ± 0.6 horas con ácido succínico y de 12.0 ± 0.7 con ácido málico. Las curvas de crecimiento con succínico pueden ser observadas en la figura 20 (paneles A y B) y las de ácido málico en la figura 20 (paneles C y D). Con otras fuentes de carbono como ácido pirúvico (Figura 20, paneles E y F) o casaminoácidos (Figura 20, panel G) las curvas de crecimiento y tiempos de generación de las cepas AM1, VS2 y VS3 son similares (3.1, 3.6 y 2.9 horas en ácido pirúvico; 6, 5.3 y 6.8 horas en casaminoácidos, respectivamente).

Como se puede observar en la figura 20 A, la habilidad de la cepa VS2 para crecer usando al ácido succínico como única fuente de carbono fue restaurada después de expresar al gen silvestre *dctR* desde el pRK415, lo que indica que ninguna otra mutación es responsable del fenotipo observado en la mutante $\Delta dctR::hyg$.



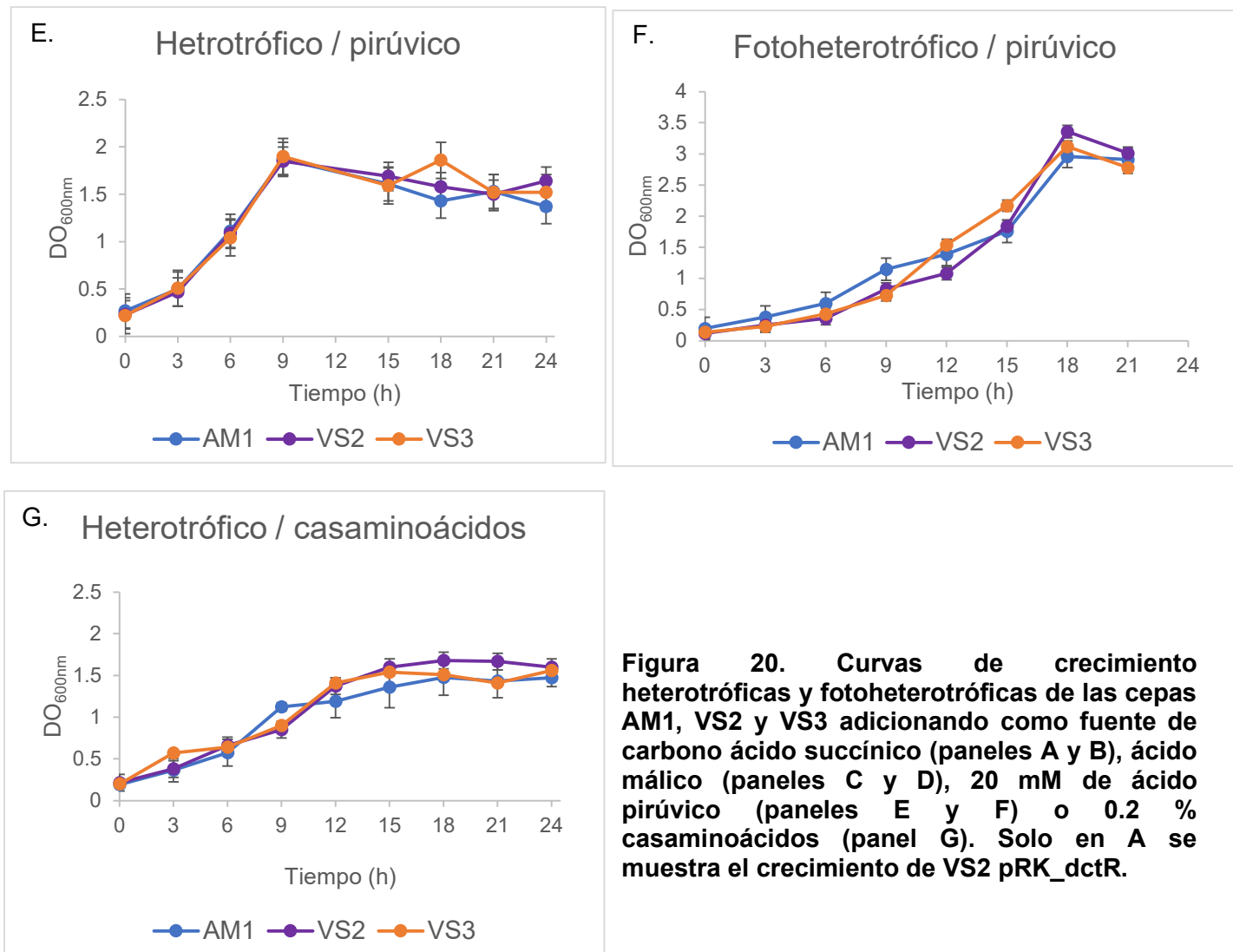


Figura 20. Curvas de crecimiento heterotróficas y fotoheterotróficas de las cepas AM1, VS2 y VS3 adicionando como fuente de carbono ácido succínico (paneles A y B), ácido málico (paneles C y D), 20 mM de ácido pirúvico (paneles E y F) o 0.2 % casaminoácidos (panel G). Solo en A se muestra el crecimiento de VS2 pRK_dctR.

Adicionalmente, al observar el crecimiento de la cepa VS3 con los alelos silvestres *dctS*, *dctSR* o *dctR* expresados desde el promotor del plásmido pRK415, se determinó que es necesario expresar en trans los genes del operón *dctSR* para restaurar el fenotipo de la mutante $\Delta dctS::hyg$. Además, se observó que en esta cepa al expresar solo el gen *dctR* desde el pRK415 se restaura el crecimiento heterotrófico en ácido succínico (Figura 21 A), lo que podría sugerir que hay otra cinasa de histidina capaz de fosforilar a DctR o que este regulador de respuesta puede actuar desfosforilado, pero no se han explorado experimentalmente estas posibilidades. Con otra fuente de carbono, como los casaminoácidos no se observó diferencia en el crecimiento de estas distintas cepas (Figura 21 B).

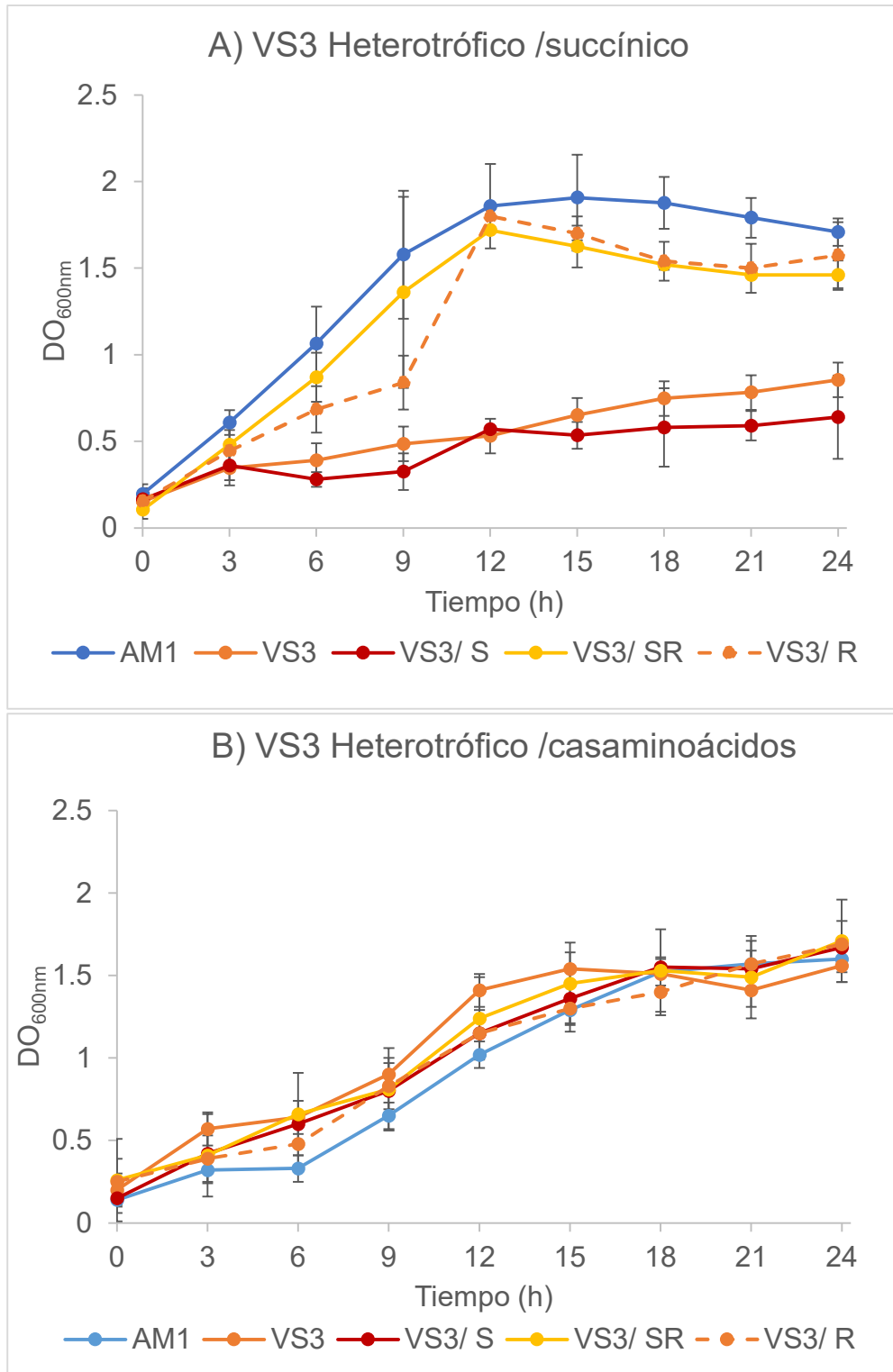
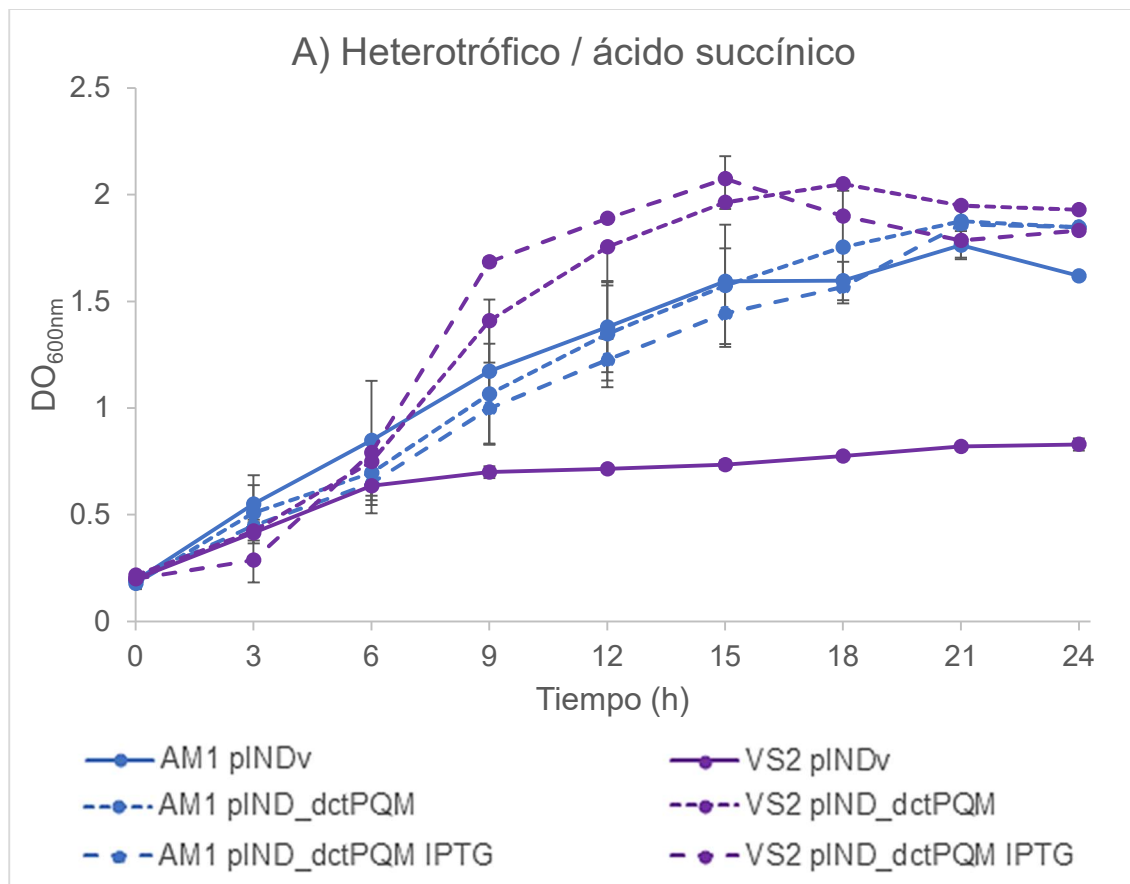


Figura 21. Curvas de crecimiento heterotrófico de las cepas VS3 complementada con las copias silvestres de los genes *dctS* (S) o *dctSR* (SR) o *DctR* (R) expresados en trans desde el plásmido pRK415. En el panel A la fuente de carbono fue ácido succínico y en el panel B fue 0.2 % casaminoácidos.

En ausencia de DctSR hay una reducción de la concentración de DctPQM

A diferencia de lo reportado para *R. capsulatus*, donde, en ausencia de DctR las células son incapaces de crecer cuando algún C4-DCB es adicionado como única fuente de carbono (Hamblin *et al.*, 1993), en *R. sphaeroides*, la cepa mutante en este regulador de respuesta (VS2) sí crece aunque más lentamente que la cepa parental. El defecto en el crecimiento provocado por la ausencia de DctR es causado por una disminución en la concentración de las proteínas del transportador DctPQM, ya que cuando se expresan los genes *dctPQM* desde el plásmido pINDGm, VS2 es capaz de recuperar la capacidad de crecer al nivel de la cepa parental AM1 (Figura 22 panel A). Además, se corroboró que en la cepa VS2 hay una menor concentración de DctP con respecto a la cepa AM1 (Figura 22 panel B), y adicionalmente se corroboró la ausencia de DctR en las cepas VS2 y VS2 que expresa a *dctPQM* desde el plásmido pINDGm (Figura 22 panel C).



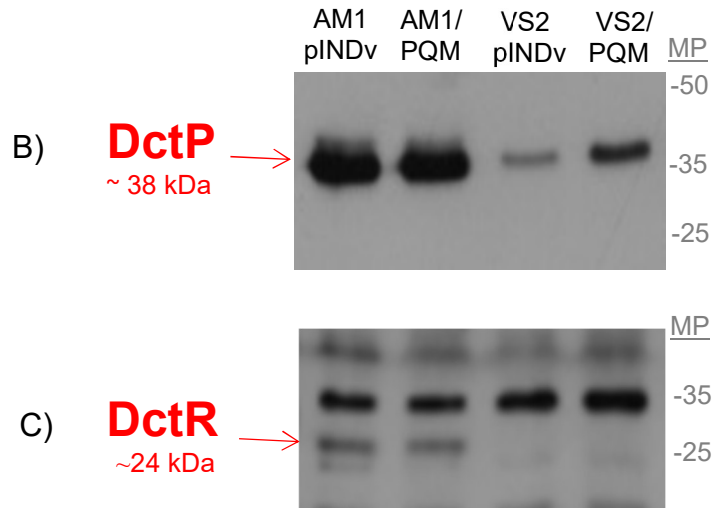


Figura 22. Curvas de crecimiento heterotrófico de las cepas AM1 y VS2 que portan el plásmido pINDGm vacío o pINDGm_dctPQM sin y con 1 mM de IPTG (panel A) e inmunodetección de DctP y DctR (paneles B y C, respectivamente) en las mismas cepas con 1 mM de IPTG.

Se requiere de DctSR para la óptima expresión de *dctPQM*

Para correlacionar el crecimiento en MMS suplementado con ácido succínico o con casaminoácidos de AM1 y de VS2 con el nivel de expresión de los genes *dctPQM*, se construyó el vector BBgusrp_dctPQM en el que se clonó la región regulatoria del operón *dctPQM* río arriba del gen reportero *uidA* que codifica para la β -glucuronidasa (Figura 23 panel A). La determinación de la actividad de esta enzima indicará la presencia de un promotor y la regulación de éste en las diferentes condiciones probadas y en los diferentes fondos genéticos.

Como se observa en el panel B de la figura 23, la mayor actividad de la β -glucuronidasa fue obtenida cuando la cepa parental AM1 fue cultivada heterotróficamente en ácido succínico, mientras que al disminuir la concentración de esta fuente de carbono a 0.1 mM, la actividad promotora del operón *dctPQM* decreció un 30 %. En el crecimiento fotoheterotrófico en ácido succínico la actividad es un 45 % menor que la actividad en crecimiento heterotrófico. En ambos casos esta actividad promotora aumenta en presencia de ácido succínico en comparación con la actividad presentada por los extractos provenientes de cepas cultivadas con casaminoácidos. En ausencia del regulador de respuesta DctR, la actividad de este promotor disminuye un 75 % en condiciones heterotróficas y un 45 % en condiciones

fotoheterotróficas. Con estos datos se sugiere que la presencia de DctR es necesaria, pero no esencial, para la activación de la transcripción de los genes *dctPQM*.

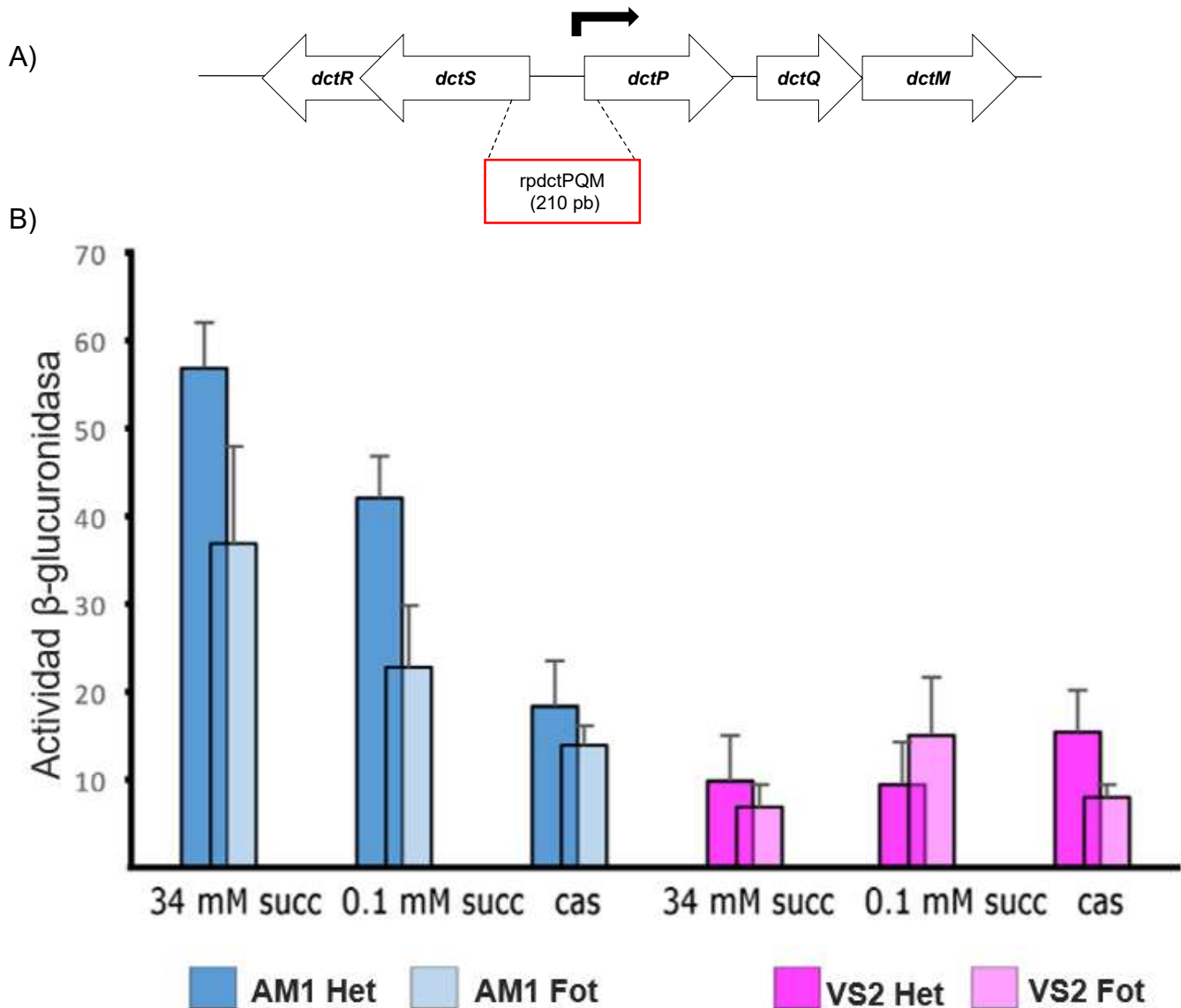


Figura 23. Actividad promotora del operón *dctPQM* en los fondos genéticos AM1 y VS2. En el panel A) se esquematiza el fragmento clonado en el plásmido pBBMCS53 que incluye la secuencia intercistronica *dctS-dctP* con la región promotora del operón *dctPQM* y además se muestra el sentido de la transcripción. En la gráfica del panel B se compara la actividad de la región promotora del operón *dctPQM* en las cepas AM1 y en la mutante del RR DctR (VS2) en crecimiento heterotrófico y fotoheterotrófico. Las células fueron cultivadas en MMS con ácido succínico en alta concentración (34 mM suc) o en baja concentración (0.1 mM suc) o con 0.2 % de casaminoácidos (cas). La actividad es expresada en nmoles MU (min mg proteína)⁻¹. Se hicieron al menos 3 experimentos independientes de los cuales se muestra la desviación estándar. MU: 4 metilumbeliferona.

DctPQM se requiere para una inducción completa del operón *dctPQM*

Con el antecedente de que algunos de los sistemas transportadores participan en la vía de señalización de los sistemas de dos componentes que regulan la expresión del propio transportador (Antoine *et al.*, 2005; Golby *et al.*, 1998; Graf *et al.*, 2014; Piepenbreier *et al.*, 2017; Scheu *et al.*, 2010; Unden *et al.*, 2016a), se exploró el papel del transportador DctPQM en la activación del sistema DctSR. Para ello se determinó la actividad del promotor *dctPQM* utilizando al plásmido pBBgus_rpdctPQM (previamente descrito), el cual fue transformado en las cepas AM1 y VS1.

Debido a que la mutante VS1 es incapaz de crecer cuando se adiciona al ácido succínico como única fuente de carbono, las cepas fueron crecidas en un medio con 0.2 % de casaminoácidos más 34 mM de ácido succínico y se colectaron en la etapa exponencial temprana (DO_{600nm} 0.4) del crecimiento celular (anexo 3).

Es de notar que al combinar las fuentes de carbono (ácido succínico y casaminoácidos) la actividad de la región promotora del operón *dctPQM* es menor que la actividad de las células que crecieron solo con ácido succínico (comparar las figuras 23 panel B con la figura 24). No está claro el porqué la adición de los casaminoácidos produce esta reducción en la actividad. Gibson en 1975 reportó que en *R. sphaeroides* el ácido aspártico no compite por el transporte de los otros C4-DCB que probó (malato, succinato y fumarato), mientras que en *R. capsulatus* este aminoácido es un competidor débil ya que sólo reduce un 10 % la unión de ácido málico a DctP (Shaw *et al.*, 1991a), por lo cual, otros mecanismos fisiológicos podrían estar involucrados en el efecto observado al combinar dichas fuentes de carbono.

De acuerdo con los datos obtenidos siguiendo la actividad específica de la enzima β -glucuronidasa, se observa que en ausencia de las proteínas transportadoras DctPQM la actividad del promotor *dctPQM* disminuye severamente en comparación con la cepa AM1 (Figura 24), por lo que se propone que el sistema transportador DctPQM o su actividad están relacionados con la señal de activación del sistema de dos componentes DctSR.

Estos resultados plantean dos posibilidades, la primera es que la activación de la cinasa DctS por el sistema transportador se dé a través de la interacción con las subunidades

transmembranales DctQM. La otra posibilidad involucraría la interacción directa entre la región periplásmica de DctS y la proteína de unión a ligando DctP.

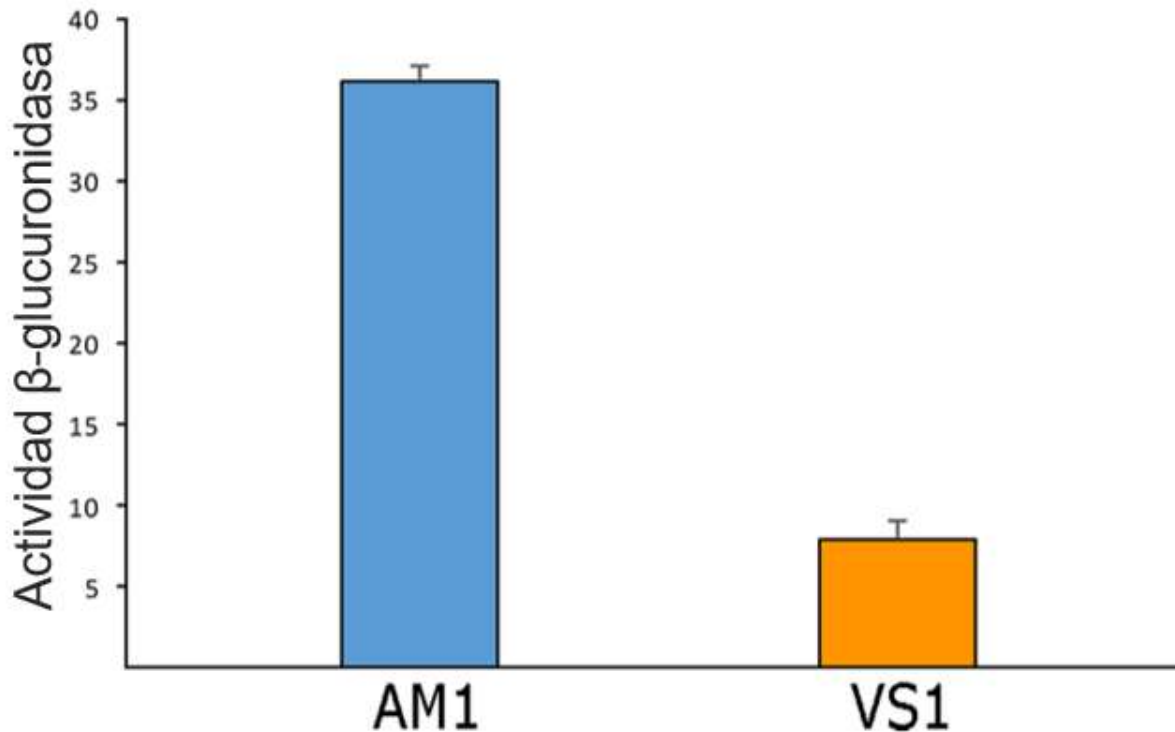


Figura 24. Actividad β-glucuronidasa correspondiente a la actividad del promotor del operón *dctPQM* en AM1 y VS1 creciendo heterotróficamente en MMS con 0.2 % de casaminoácidos más 34 mM de ácido succínico. Se realizaron al menos 3 ensayos independientes y se muestra la desviación estándar.

DctP-succínico activa al sistema DctSR

Una vez determinado que la ausencia del transportador DctPQM reduce la actividad del promotor de *dctPQM*, se decidió explorar si la proteína periplásmica de unión a ligando, DctP, era el componente del transportador que, además de estar cumpliendo con su papel en el transporte de C4-DCB al unir con alta afinidad al ligando y acercarlo a la permeasa DctM, podría también, estar actuando como cosensor de la concentración de estos compuestos y permitir así la activación de DctS. Para ello se clonó en pRK415 el promotor del operón *dctPQM* fusionado transcripcionalmente al gen reportero *uidA* (codificante para la β-glucuronidasa) en sentido inverso del promotor *lac* presente en el plásmido pRK415. El

plásmido que contenía esta construcción fue conjugado en las cepas AM1, VS1 y VS2. En estas cepas también se cotransformaron los plásmidos pIND4 o pINDGm_dctP (que expresa solo al gen *dctP* a partir del promotor sintético inducible con IPTG del plásmido pIND4). Se tiene evidencia de que aún en ausencia del inductor IPTG hay transcripción de *dctP* (Anexo 2), por lo cual en las cepas AM1 y VS2 se sumaría esta baja transcripción con la transcripción de los genes desde sus *loci* en el cromosoma.

En la etapa de crecimiento logarítmica temprana (entre 0.3 y 0.4 de densidad óptica a 600 nm) la mayor actividad del promotor de *dctPQM* se observa en la cepa VS1 cuando DctP está siendo expresado desde el pIND. Como se observa en VS2, dicho incremento es dependiente de la presencia de DctR, lo que sugiere que DctP es parte del sistema sensor que promueve la expresión del operón *dctPQM* en presencia de C4-DCB. En la cepa AM1 también se incrementa la actividad de este promotor cuando se expresa DctP desde el pIND en presencia de ácido succínico, sin embargo, este incremento es menor al presentado por VS1 en las mismas condiciones. Tomando en cuenta que en la cepa AM1 está presente DctQM, por lo cual el transportador está activo translocando los C4-DCB del periplasma al interior celular, lo que podría estar compitiendo por DctP y de este modo reduciendo la cantidad de DctP-succínico que podría estar en contacto con la cinasa DctS, disminuyendo como consecuencia la señal de activación de DctR. Como se observa en las barras correspondientes a la cepa VS1 pRK_rpdctPQM pIND_dctP se establece una relación entre la activación de este promotor, la presencia de DctP (corroborada por inmunodetección) y la adición de ácido succínico (Figura 25 A y B).

En la figura 25 B también se puede observar a través de la inmunodetección de DctP que la proteína es estable en estas condiciones de crecimiento y que la baja actividad en los extractos de células cultivadas con ácido pirúvico más casaminoácidos no es derivada de una ausencia de DctP.

Estos resultados apoyan la propuesta de que DctP unido a su ligando (ácido succínico) forma parte de la vía de señalización del sistema de dos componentes DctSR, siendo el complejo DctP-succínico la señal de activación de la cinasa de histidina DctS.

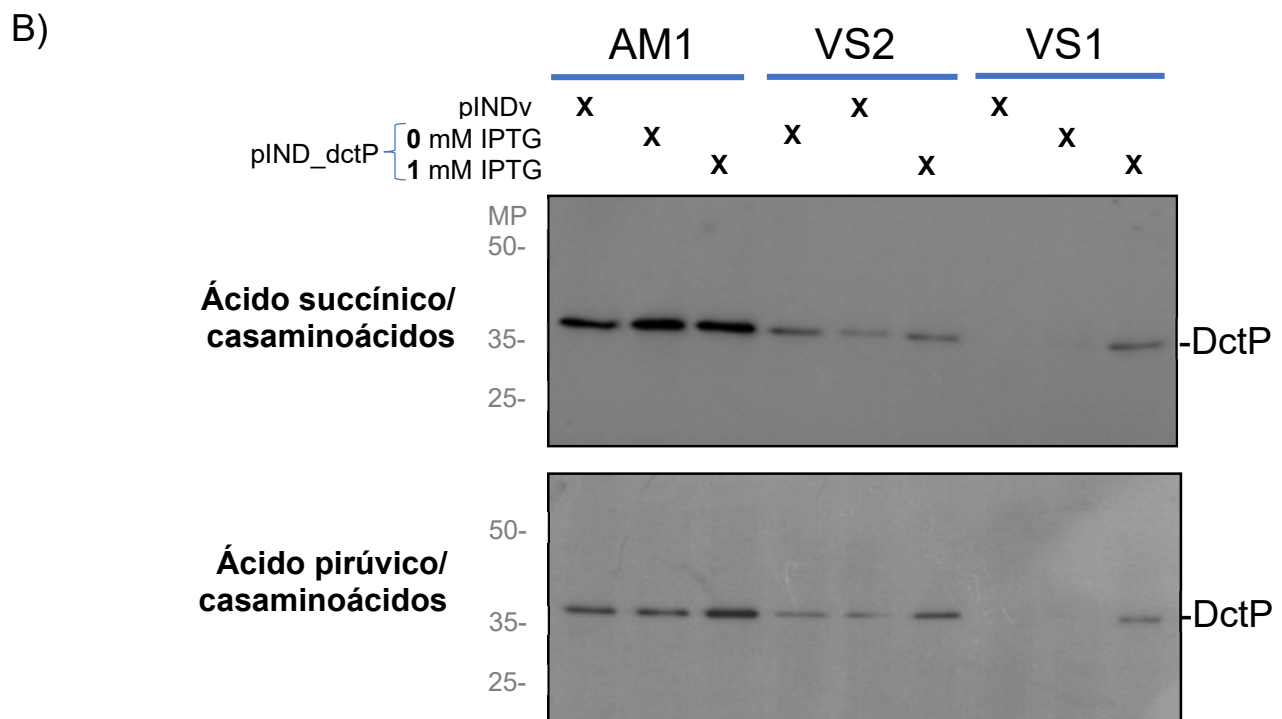
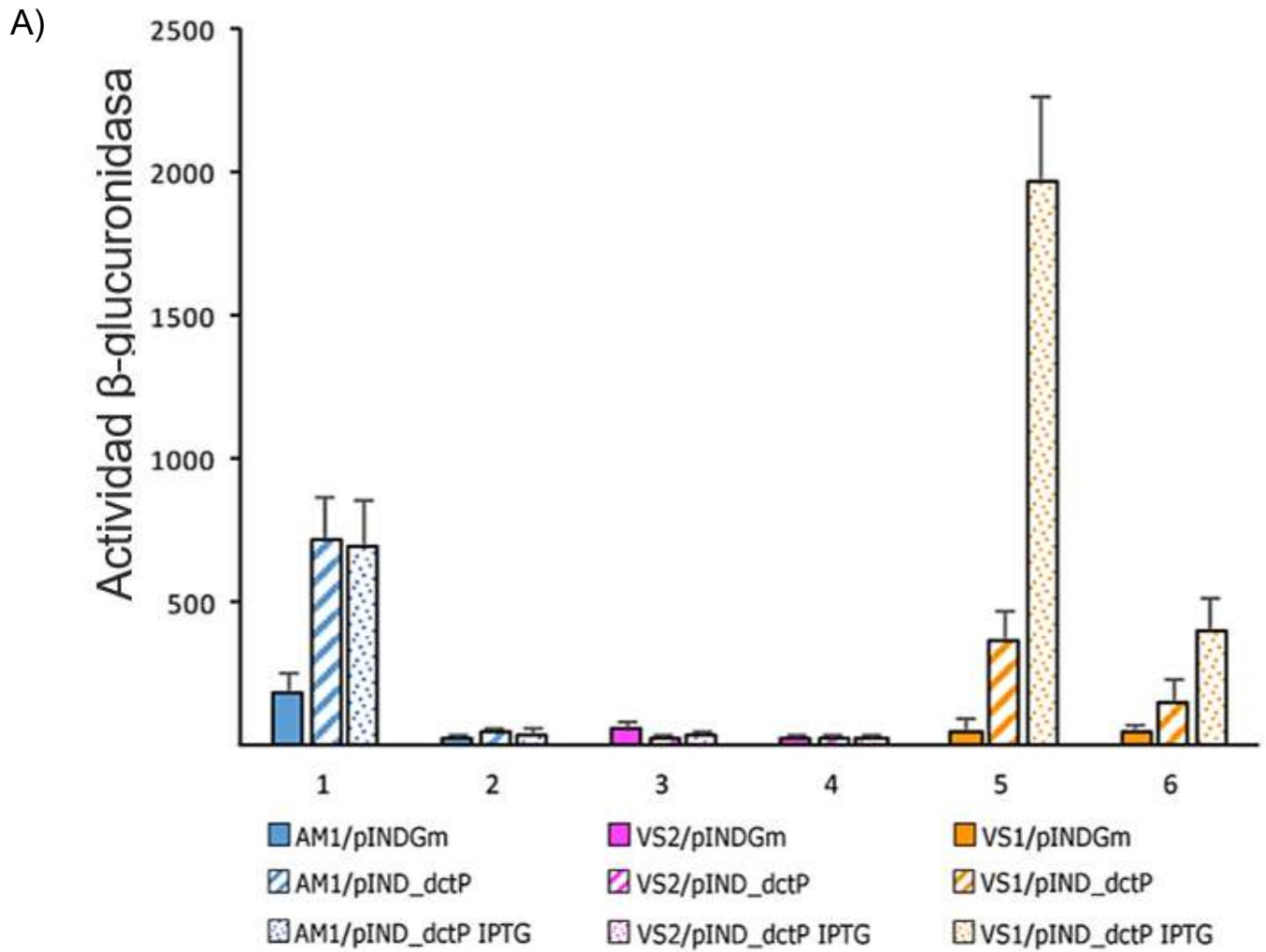


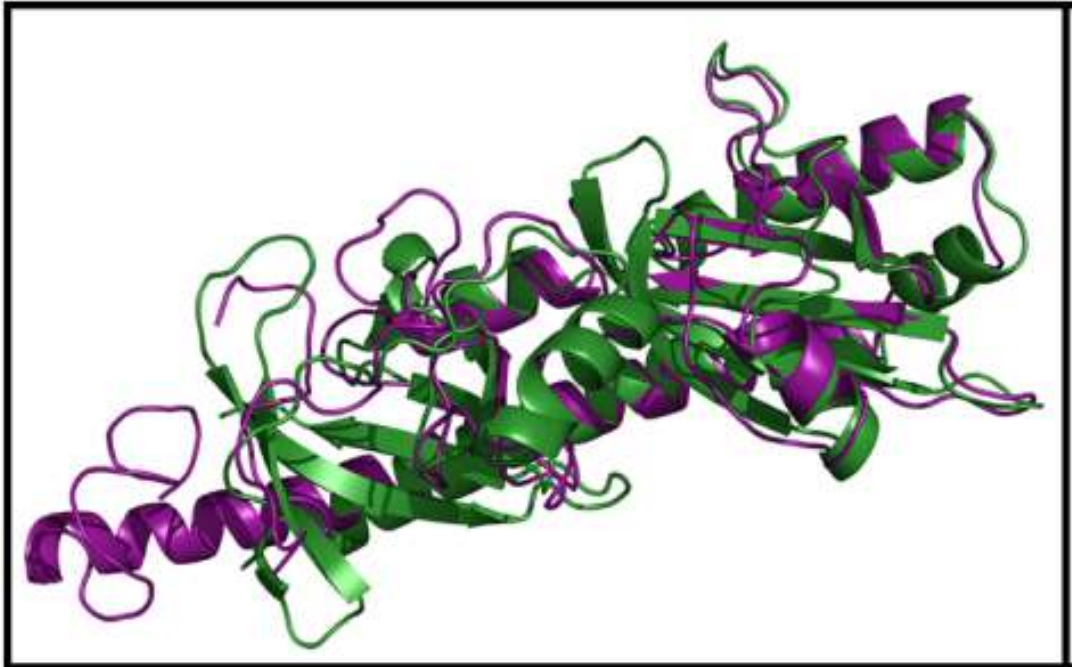
Figura 25. Efecto de DctP sobre la activación del sistema DctSR. En A) actividad β -glucuronidasa resultado de la actividad del promotor del operón *dctPQM* en las cepas AM1, VS1 y VS2 que llevan los plásmidos compatibles pRK_rpdctPQM más el plásmido pINDGm vacío o el plásmido pIND_dctP (sin adicionar el inductor IPTG o con 1 mM de IPTG). Al menos 3 experimentos independientes fueron llevados a cabo, se indica la desviación estándar. En B) Inmunodetección de DctP en los extractos totales de las cepas usadas para los experimentos mostrados en el panel A), en cada pozo se cargaron 5 μ g de proteína y se muestra la migración de los marcadores de peso molecular (MP= ovoalbúmina ~50,000 kDa; anhidrasa carbónica ~35,000 kDa y β -lactoglobulina ~25,000 kDa). Todas las cepas crecieron hasta una densidad óptica a los 600 nm de 0.4 ($DO_{600nm}=0.4$) heterotróficamente en medio mínimo Sistrom adicionado con 34 mM de ácido succínico más 0.2 % casaminoácidos (Suc/ cas) o con 20 mM de ácido pirúvico más 0.2 % casaminoácidos (Pir/ cas) como fuentes de carbono.

Análisis del dominio periplásmico de DctS. Comparación de la estructura de los dominios sensores de las cinasas de histidina

La cinasa de histidina DctS de *R. sphaeroides* (DctS_Rs) tiene bajo porcentaje de identidad con otras cinasas de histidina relacionadas con la detección o monitoreo directo de la presencia de C4-DCB [20 % de identidad con DctB de *Vibrio cholerae* (DctB_Vc) y 24 % de identidad con DctB de *Sinorhizobium meliloti* (DctB_Sm), la mayoría de los residuos conservados están ubicados en el extremo C-terminal (ver alineamiento en el anexo 4).

De acuerdo con la predicción de la estructura terciaria del dominio periplásmico de DctS hecha en el servidor I-TASSER, donde, el valor de TM-score de 1 es considerado como una similitud topológica perfecta y el 0 es asignado a proteínas no relacionadas entre sí. La mayor semejanza estructural del fragmento periplásmico de DctS_Rs, con un TM-score de 0.74, se da con el dominio periplásmico de DctB_Sm [Protein Data Bank (PDB) ID:3E4O] (Figura 26 A) y seguidamente con un TM-score de 0.67 se encuentra el dominio periplásmico de DctB_Vc [PDB ID: 3BY9] (Figura 26 B).

A) Modelo DctS de *R. sphaeroides*/ DctB de *S. meliloti*



B) Modelo DctS de *R. sphaeroides*/ DctB de *V. cholerae*

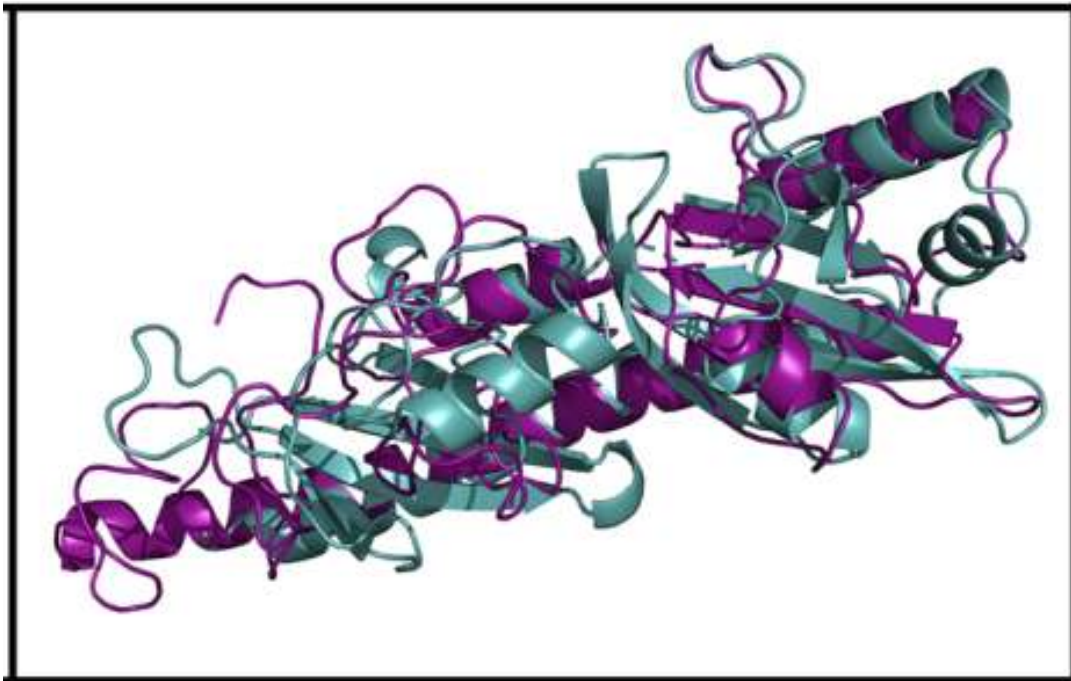


Figura 26 Alineamiento de la estructura terciaria del dominio periplásmico de DctS de *R. sphaeroides* (color magenta) predicha por el servidor I-TASSER con las estructuras terciarias del dominio sensor de DctB de *S. meliloti* (color verde; panel A) y de DctB de *V. cholerae* (color cyan; panel B).

Los dominios periplásmicos de DctB_Sm y de DctB_Vc fueron cristalizados en complejo con sus ligandos (malato y succinato, respectivamente). En la estructura cristalográfica de la región periplásmica de DctB_Sm reportada por Zhou y colaboradores (2008), se reconoce que los residuos involucrados en la formación de dos puentes de hidrógeno y dos puentes salinos con los dos grupos carboxilo del ligando son: F144, Y149, R152, Y154, G170, T171, V172, S173, Y179 y K197. Mientras que en la estructura cristalográfica del dominio periplásmico de la cinasa DctB_Vc (Cheung & Hendrickson, 2008) los residuos R130, Y132, G148, S149, S151, Y157, K175 y T150 forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de los carboxilatos del succinato y los residuos F122 y F127 participan en las interacciones hidrofóbicas con el ligando. A pesar de la relativamente buena coincidencia de las estructuras terciarias de estos dominios con el mismo dominio de DctS_Rs, en el análisis de las estructuras en el servidor COACH, no se predice una conformación similar de los tres sitios activos (Figura 27). De acuerdo con este análisis se predice, con un bajo nivel de confiabilidad (C-score de 0.08, donde el máximo es 1.0), que los residuos A112, D113, E114, L133, M134 y D135 de DctS_Rs podrían estar involucrados con la unión del malato, además de que no se observan los residuos aromáticos, ni los residuos positivos característicos de DctB_Sm y DctB_Vc. Lo anterior sugiere que DctS_Rs podría no unir estos C4-DCB, aunque, es necesario una aproximación experimental con la que se pueda descartar o confirmar la unión directa de los C4-DCB al dominio sensor de DctS_Rs.

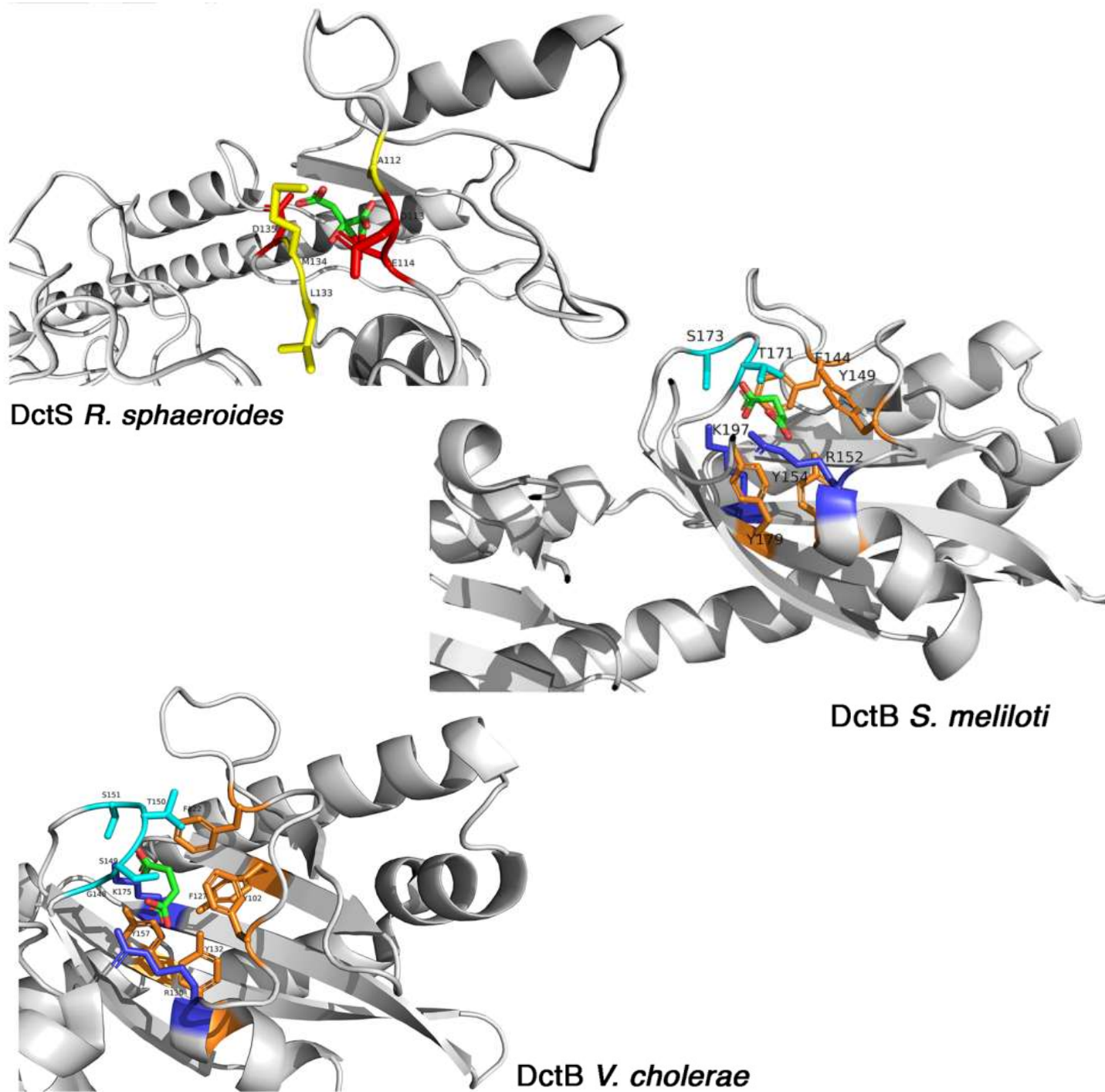


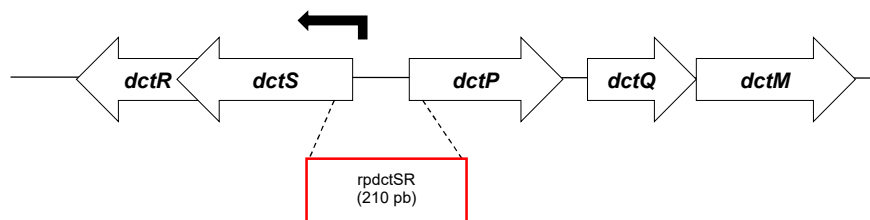
Figura 27. Predicción en el servidor COACH del sitio de unión del malato con la cinasa DctS_Rs, sitio de unión del succinato a la cinasa DctB_Sm (PDB ID:3E40) y del sitio de unión del succinato a la cinasa de histidina DctB_Vc (PDB ID: 3BY9). En color azul se muestran los residuos positivamente cargados (arginina y lisina), en rojo se resaltan los residuos cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico), en color naranja están los residuos aromáticos (fenilalanina y tirosina), en cian se representan los residuos polares no cargados (serina y treonina) y en amarillo los residuos no polares alifáticos (alanina, leucina y metionina).

La expresión de *dctSR* es independiente de DctR

Para determinar si la expresión de *dctSR* es regulada por la presencia de ácido succínico en el medio de cultivo, se utilizó el plásmido pBBgus_rpdctSR, que tiene fusionada la región promotora del operón *dctSR* (Figura 28 panel A) con el gen reportero *uidA*. Este vector fue clonado en la cepa parental AM1 y la actividad β -glucuronidasa fue medida en extractos solubles de células creciendo tanto heterotróficamente como fotoheterotróficamente hasta una DO_{600nm} de 0.4 en un medio con 0.2 % de casaminoácidos más 34 mM de ácido succínico o 0.2 % de casaminoácidos más 0.1 mM de ácido succínico. La actividad de la región promotora de *dctSR* es independiente de la concentración de ácido succínico (Figura 28 panel B; AM1), pero, en condiciones de crecimiento fotoheterotrófico el promotor de este operón disminuye un 66 % con respecto a la actividad en crecimiento heterotrófico.

Para explorar si el sistema de dos componentes DctSR se autorregula, se midió la actividad del promotor *dctSR* en el fondo genético VS2 ($\Delta dctR::hyg$) y se determinó que al igual que en la cepa parental AM1, la expresión de *dctSR* es independiente de la concentración de ácido succínico en el medio. También se determinó que la transcripción de este operón es independiente de DctR, pero este regulador de respuesta es necesario para disminuir la expresión de estos genes en condiciones de crecimiento fotoheterotróficas (Figura 28 panel B; VS2). Esta reducción de la expresión de *dctSR* y su efecto sobre la expresión de *dctPQM* pueden ser necesarios para asegurar un balance redox apropiado en esta condición de crecimiento, como se observó en los resultados de la figura 17.

A)



B)

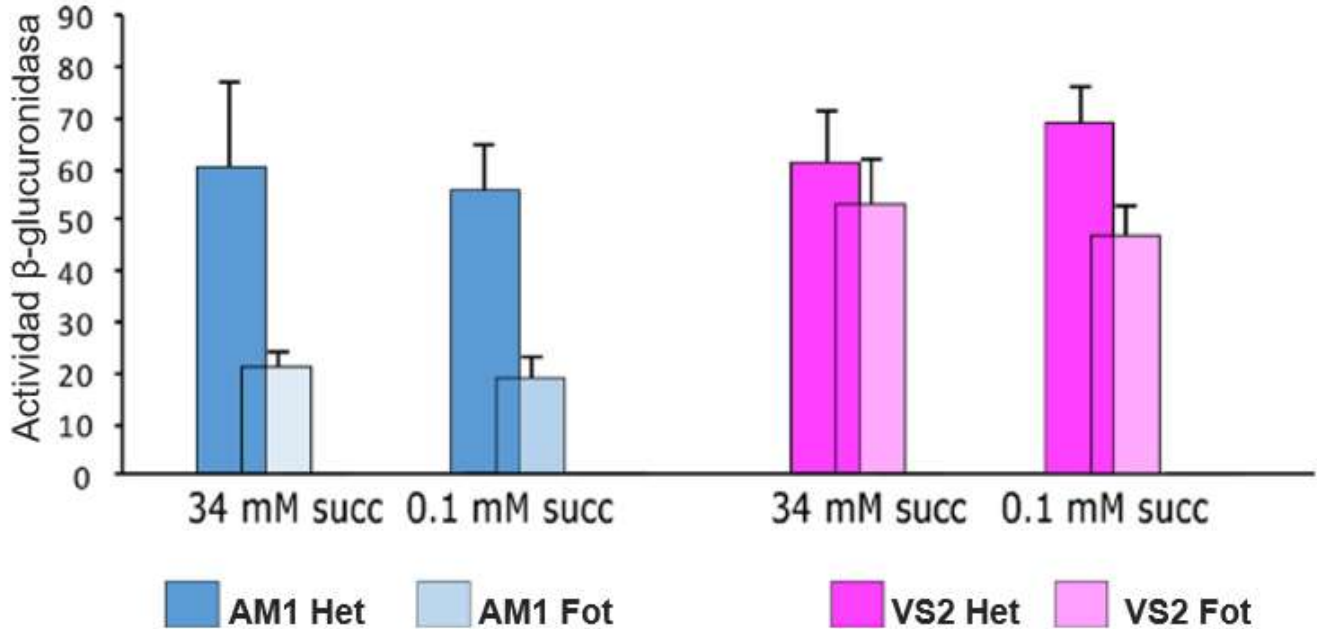


Figura 28. Actividad de la región promotora del operón *dctSR* medida a partir del plásmido pBBgus_rpdctSR en los fondos génicos de las cepas AM1 y VS2. En A) se muestra el esquema de la región promotora y del sentido de la transcripción del operón *dctSR*. En B) Actividad β -glucuronidasa de ambas cepas en condiciones heterotróficas (Het) y fotoheterotróficas (Fot) en medios con diferentes concentraciones de ácido succínico (34 o 0.1 mM) más 0.2 % de casaminoácidos. Los experimentos fueron hechos por lo menos 3 veces y se muestran las desviaciones estándar.

DctR se une a la región regulatoria de *dctPQM*

Para determinar si DctR está regulando la transcripción de *dctPQM* al unirse directamente a la región promotora de este operón se hicieron ensayos de retardo en la movilidad electroforética usando una mutante puntual de DctR en donde se cambió el residuo aspártico 53 fosforilable por un residuo glutámico, con lo que se simula un estado activo constitutivo (en el anexo 1 B se muestra la sobreexpresión y purificación de esta proteína). La secuencia de DNA usada como blanco fue el fragmento de 210 pb que contiene la región regulatoria del operón *dctPQM*, la cual fue obtenida por PCR utilizando los oligonucleótidos RPdctPQM1 y RPdctPQM2. Esta región, denominada como rpdctPQM, corresponde al mismo fragmento fusionado con el gen reportero *uidA* en el plásmido pBB1gus usado para medir la actividad del

promotor *dctPQM* (ver métodos y figura 23 A). Como se puede observar en la figura 29 (A), DctR_{D53E} forma un complejo con el fragmento *rpdtPQM*, lo cual modifica el desplazamiento electroforético de esta secuencia de DNA. Este complejo es estable aún con la adición de un fragmento de 100 pb de DNA no relacionado (Figura 29 B).

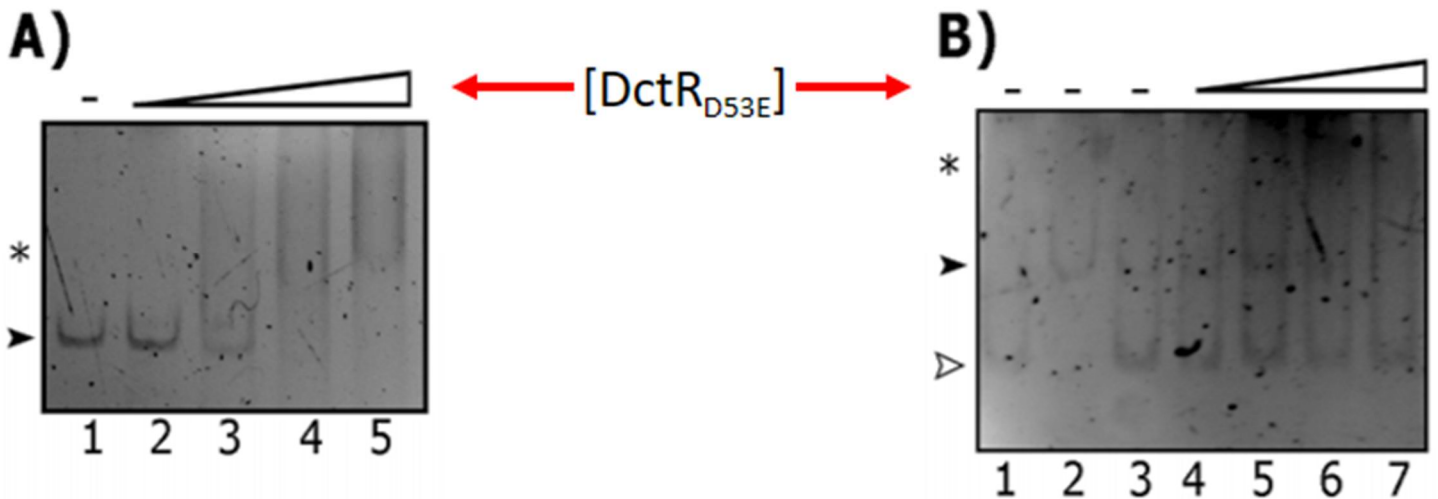


Figura 29. Retardo en la movilidad electroforética de la región promotora del operón *dctPQM* por la proteína DctR_{D53E}. En el panel A) se muestra la migración del fragmento de 210 pb de DNA correspondiente a la *rpdtPQM* (carril 1); en los carriles siguientes (2-5), además de la *rpdtPQM*, se agregaron concentraciones progresivas de DctR_{D53E} (0.5, 1, 2 y 3 μg, respectivamente). En el panel B) carril 1 se incluyó solo el fragmento de 100 pb de DNA inespecífico, en el carril 2 se adicionó solo al fragmento de la *rpdtPQM*, en el carril 3 se encuentra la mezcla de ambos fragmentos sin la adición de la proteína y en los siguientes carriles (4-7) además de la mezcla de los dos fragmentos de DNA, se adicionaron concentraciones progresivas de DctR_{D53E} (0.5, 1, 2 y 3 μg, respectivamente). Con las cabezas de flecha negras y blancas se muestra la migración del fragmento de DNA correspondiente a la *rpdtPQM* y la migración del fragmento de DNA inespecífico, respectivamente. Con asterisco se marca la migración del complejo DctR-*rpdtPQM*.

Predicción del motivo de unión de DctR

En el trabajo de Hamblin y colaboradores (1993) se propone que una de las tres secuencias con simetría diada presentes en la región de 139 pb entre los genes *dctS-dctP* podría ser el posible sitio de unión de DctR (DctR box) en *R. capsulatus* (Figura 30 A). La región intercistrónica *dctS-dctP* de *R. sphaeroides* presenta un 47 % de identidad con la misma región de *R. capsulatus*, compartiendo uno de los posibles sitios de unión a DctR (marcado

como 1 A y 1 B en la figura 30 B). En el codón de inicio de *dctS* de ambas especies se encuentran codificados aminoácidos diferentes a la metionina (M); leucina (L) en el caso de *R. capsulatus* y valina (V) en el caso de *R. sphaeroides*. Los codones de inicio CTG (L) y GTG (V) son menos eficientes que AUG, lo que podría resultar en un nivel de expresión más débil de este gen (Ambulos *et al.*, 1990; Hamblin *et al.*, 1993).

A) *Rhodobacter capsulatus*



B) *Rhodobacter sphaeroides*

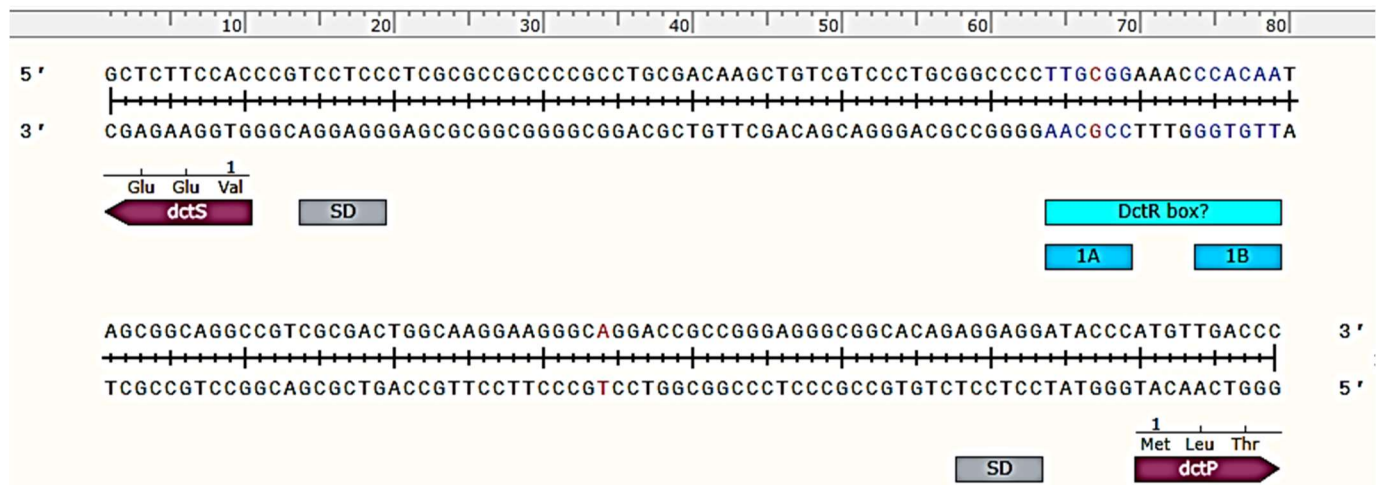


Figura 30. Representación de la región intercistrónica *dctS-dctP* de *R. capsulatus* (*Rcap*) y *R. sphaeroides* (*Rsph*). En A) se muestran las 3 secuencias con simetría díada (1 A, 1 B, 2 y 3) y las secuencia Shine-Dalgarno (SD) identificadas en *Rcap* por Hamblin y colaboradores en 1993. En B) se muestra la misma región de *Rsph* con simetría díada reconocida en esta (1A-B) y las secuencias SD propuestas. Con letras rojas se muestran los sitios de inicio de la transcripción de *dctS* y de *dctP* predichos por Henry y colaboradores (2020) para *R. sphaeroides* 2. 4. 1.

Usando una aproximación de genómica comparativa con ayuda de la herramienta Gene Context Tool NG (<http://biocomputo.ibt.unam.mx:8080/GeConT/>) se hizo la búsqueda de las secuencias río arriba del gen *dctP* en diferentes especies bacterianas donde se conserva la sintenia *dctS-dctP*. Solo en nueve especies se encontró conservada esta característica, cinco de ellas son α -proteobacterias y cuatro β -proteobacterias (Figura 31). La longitud de la región entre estos genes va desde los 102 pb hasta los 482 pb y las secuencias de estas regiones son mostradas en el anexo 5.

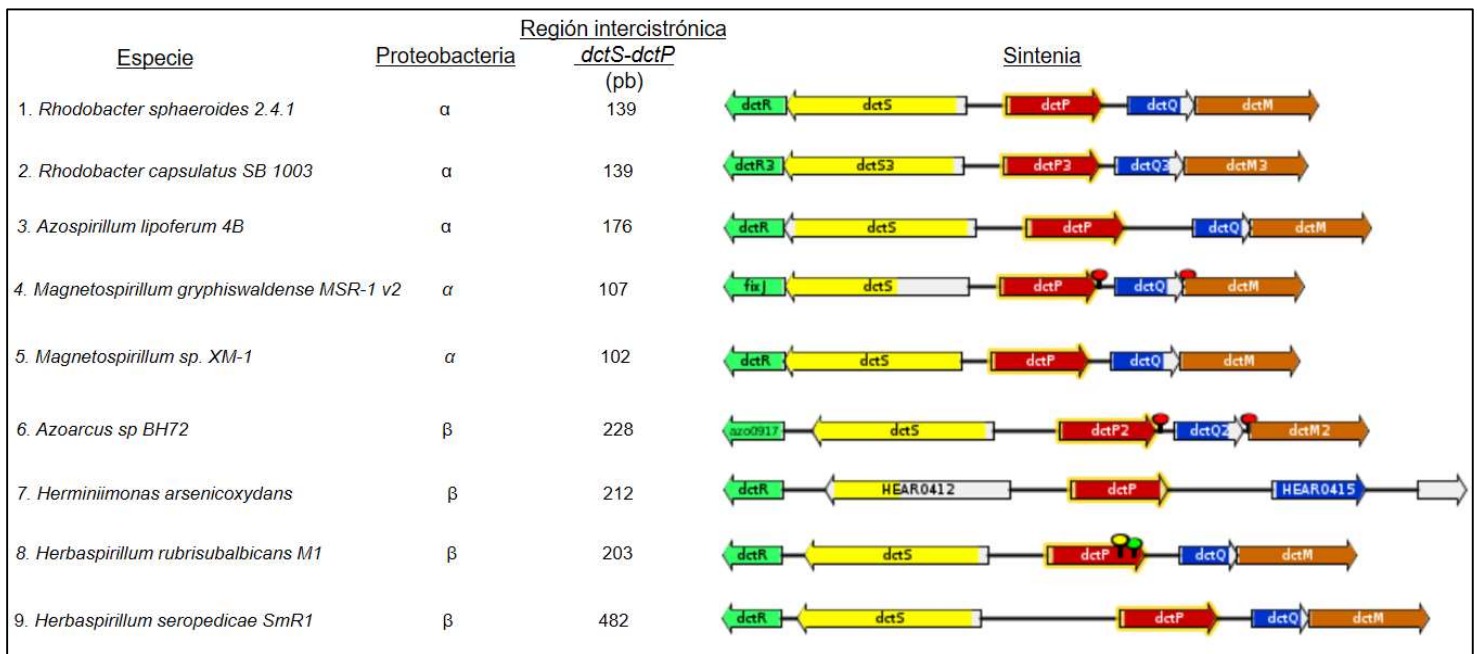
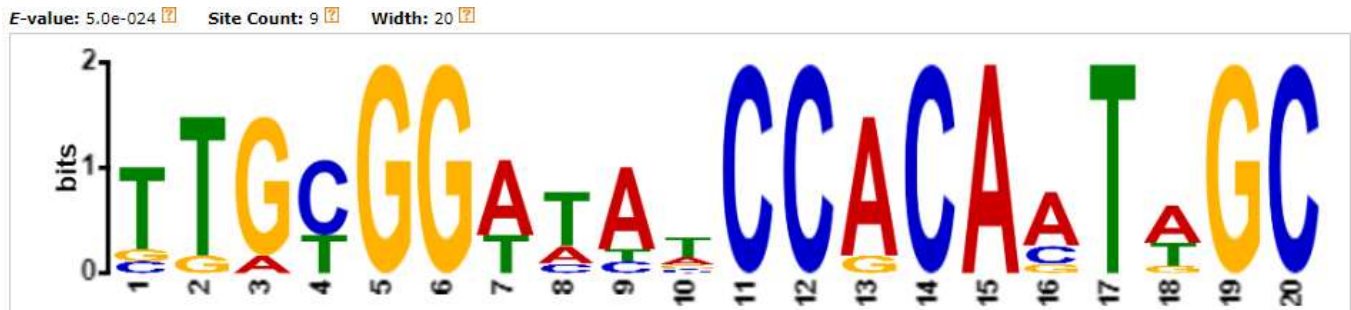


Figura 31. Lista de algunas especies en las que se conserva la sintenia *dctS-dctR* de acuerdo con Gene Context Tool NG.

El análisis bioinformático de las secuencias intercistrónicas *dctS-dctP* fue limitado debido a que, a pesar de que los genes *dctPQM* están bien representados en bacterias, fueron pocas las especies encontradas donde se conserva la sintenia *dctSR-dctPQM*. Por ejemplo, *dctSR* están también asociados o contiguos a los genes *dctA* (como en *Clavibacter michiganensis*), a *dctB* (como en *Bacillus subtilis*) o a ambos genes *dctB-dctA* que están en operón (como en *Geobacillus* sp). También, el operón *dctPQM* puede estar contiguo a otros genes codificantes de proteínas regulatorias como con DctBD en *Pseudomonas aeruginosa*, por lo cual estas especies no fueron tomadas en cuenta para el análisis de los posibles sitios de unión de DctR.

Las secuencias fueron analizadas en MEME (Bailey *et al.*, 2009; <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) para buscar motivos comunes que podrían ser el sitio de unión de DctR, el resultado de este análisis presente en la figura 32.

A)



B)

Name	Strand	Start	p-value	Sites
3. Azospirillumlipoferum	+	67	2.26e-11	CAGGCCGACT CTGCGGATATCCACAATAGC CGCAATTGCG
1. Rsphaeroides	+	54	7.03e-11	CTGCGGCCCC TTGCGGAAACCCACAATAGC GGCAGGCCGT
8. Herbaspirillumrubrisubalbicans	+	74	1.42e-10	gctgggaaca TTGTGGTTATCCACAATAGC ccogATTTGG
9. Herbaspirillumseropedicae	+	83	1.89e-10	CCTGGGGACA TTGTGGTTAACCACACTTGC CCGTTTTTGG
6. AzoarcusBH72	+	72	2.03e-10	AAGTTGGTTC TTGCGGACTTCCACAATAGC AGCTGCGATC
4. Magnetospirillumgryphiswaldense	+	19	2.74e-10	GATGCTCATT TGACGGATATCCACAATAGC TCAGTGAACG
7. Herminimonasarsenicoxydans	+	131	4.57e-10	CTGCGTCGTG GTGCGGTTATCCACACTTGC GGAAAATTGA
2. Rcapsulatus	+	53	7.68e-10	TGTC'TTCCGA TTGCGGAAAGCCGCAATAGC GTTGCGCAAG
5. Magnetospirillum	+	14	8.20e-10	TCCTTTCCCTC TTGTGGATCACCACAATAGC CGAGCCTTGG

C)



Figura 32. En el panel A) se muestra el logo de la secuencia consenso del posible motivo de unión de DctR propuesto en este trabajo y analizadas en MEME. En los paneles B y C) se muestra el contexto y la ubicación del motivo conservado en la secuencia intercistrónica *dctS-dctP* de 9 especies de bacterias donde se conserva la sintenia.

De acuerdo con análisis de la secuencia de DctR de *R. sphaeroides* en InterPro, el dominio de unión a DNA está comprendido entre los residuos 132 y 197. Las secuencias de aminoácidos de DctR de las nueve especies de bacterias en las que se conserva la sintenia *dctS-dctP*

presentan entre 48 y 72 % de identidad y todas conservan 9 de los 16 residuos propuestos como importantes para la unión al DNA (anexo 6).

Predicción de algunos blancos de DctR

El motivo obtenido del análisis en MEME de las secuencias intercistrónicas *dctS-dctP* de estas nueve especies fue usado para construir una matriz de peso posicional y con ella hacer una búsqueda de posibles blancos de DctR en el genoma de *R. sphaeroides* WS8N.

De los posibles sitios de unión predichos, solo cinco se encuentran en regiones intercistrónicas: RSWS8N_05710-RSWS8N_05715; RSWS8N_06565-RSWS8N_06570; *thrS*-RSWS8N_07235; RSWS8N_09980-RSWS8N_09985 y RSWS8N_10300-RSWS8N_10305.

Con respecto a los genes 09980 y 09985, cuyos productos corresponden a DctS y DctP, respectivamente, el posible sitio de unión de DctR se encuentra a 57 pb del codón de inicio de *dctS* y a 82 pb del codón de inicio de *dctP*.

Entre los genes 05710 (donde está codificada la subunidad Q de un posible transportador tipo TRAP de manitol/ cloroaromático) y 05715, que es el primer gen del operón que codifica las subunidades de la NADH-ubiquinona oxido reductasa, un complejo enzimático que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q, se encuentra una región de 388 pb donde se predice un posible sitio de unión de DctR, a 100 pb y a 267pb, respectivamente de los codones de inicio de estos genes. En cuanto al gen 06565 codificante para la deoxirribulosa 5-fosfato sintasa relacionada con la biosíntesis de isoprenoles y en el mismo sentido de la transcripción, se encuentra el gen 06570 codificante para PufX componente del complejo cosechador de luz I, el posible motivo de unión de DctR se encontraría a 29 pb del codón de inicio de 06565. Para el gen 07235, cuyo producto esta anotado como una proteína relacionada con el choque térmico, el posible motivo de unión de DctR se encuentra a 357 pb de su codón de inicio. El gen *thrS* se encuentra en el mismo sentido de la transcripción y su producto es la treonina tRNA ligasa que cataliza la unión de la treonina con su tRNA. Por último, en la región entre los genes 10300, codificante para la malato deshidrogenasa y 10305 que se predice codifica para una permeasa, el posible sitio de unión de DctR se encuentra a 86 pb del codón de inicio de 10300 y a 138 pb del codón de inicio de 10305.

Salvo la región intercistronica *dctS-dctP* donde ya se comprobó que DctR se une directamente, se necesita demostrar experimentalmente si este motivo es el que reconoce el regulador de respuesta DctR, si estos genes están bajo su control y las implicaciones fisiológicas que este control tendría.

Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se determinó que los productos de los genes RSWS8N_09985, RSWS8N_09990 y RSWS8N_09995 constituyen las subunidades estructurales del transportador DctPQM y que los productos de RSWS8N_09980 y RSWS8N_09975 son las proteínas reguladoras DctS y DctR del principal sistema transportador de C4-DCB en *R. sphaeroides*, homólogo al sistema Dct de *R. capsulatus*.

En la figura 33 se encuentra la representación esquemática del sistema Dct en *R. sphaeroides*. Estructuralmente el transportador está formado por las proteínas integrales de membrana DctQ-DctM y la proteína de unión a ligando periplásmica DctP, que une con alta afinidad a los C4-DCB. Los genes que codifican para cada una de estas subunidades estructurales están regulados de una forma ligando dependiente por el sistema de dos componentes formado por la cinasa de histidina DctS y por el regulador transcripcional DctR. En este trabajo se propone que la activación de DctS ocurre a través de la interacción directa entre su dominio periplásmico y DctP unido a un C4-DCB. Estableciéndose el complejo sensor/regulador DctP-DctS-DctR.

A pesar del alto porcentaje de identidad entre el sistema Dct de *R. capsulatus* y el de *R. sphaeroides* se encontraron diferencias significativas entre su regulación y su función. En *R. capsulatus* el sistema Dct ha sido extensamente estudiado y se ha demostrado que es esencial para el consumo de C4-DCB durante el crecimiento heterotrófico, pero no lo es para el crecimiento fotoheterotrófico ya que otros sistemas de baja afinidad, aún desconocidos, pueden sustituir parcialmente su función. En contraste, en *R. sphaeroides* el transportador DctPQM es esencial tanto para el crecimiento heterotrófico como para el crecimiento fotoheterotrófico en un medio cuyo único suplemento de carbono es un C4-DCB. Adicionalmente, en *R. capsulatus* la transcripción de los genes *dctPQM* depende del sistema de dos componentes DctSR, pero, en *R. sphaeroides* DctR activa la transcripción de los genes *dctPQM* en respuesta a la presencia de C4-DCB en el medio, sin embargo, no es esencial, porque aún en ausencia de este regulador se puede detectar actividad del promotor y además se puede inmunodetectar a DctP en extractos totales.

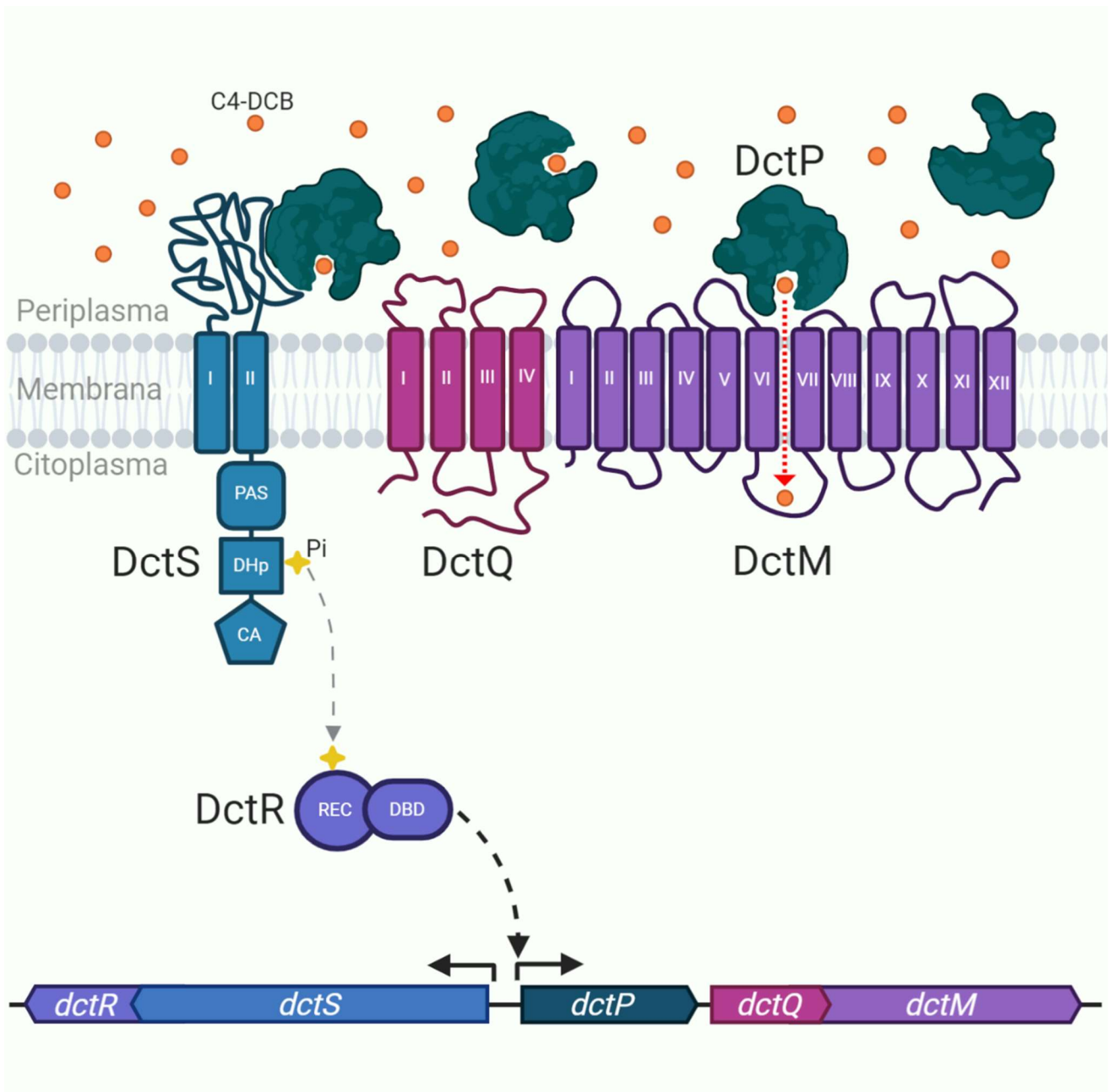


Figura 33. Modelo del sistema transportador de los ácidos C4-dicarboxílicos (C4-DCB) Dct en *R. sphaeroides*. De acuerdo con este modelo, en presencia de C4-DCB, la proteína DctP unida a su ligando, un C4-DCB, interactúa directamente con el dominio periplásmico de la cinasa de histidina DctS lo que provoca su activación (reportado en este trabajo). Consecuentemente, DctS fosforila al regulador transcripcional DctR, que de esta forma se une a la región promotora de *dctPQM* estimulando su expresión (Forward, *et al.*, 1997; Hamblin *et al.*, 1993). Los dominios funcionales de DctS están indicados: el dominio PAS (Per-Arnt-Sim) como un cuadrado redondeado, el dominio DHp (por Dimerization Histidine phosphotransfer) como un cuadrado y el dominio CA (catalítico) como un pentágono. También se indican los dominios del regulador de respuesta DctR: REC (receptor del regulador de respuesta) como un círculo y el dominio DBD (unión a DNA) como un óvalo.

La transcripción de *dctPQM* independiente de DctR, asegura que el transportador DctPQM esté ya disponible cuando comience a haber succinato en el medio. Así, DctP en complejo con un C4-DCB, actúa como cosensor de la presencia del ligando en el medio lo que provocaría la activación de DctS y la fosforilación de DctR. DctR-Pi incrementa la transcripción de *dctPQM*, permitiendo que haya más transportador disponible para el consumo de succinato. La mayor expresión del transportador durante el crecimiento heterotrófico asegura un transporte eficiente del ligando necesario para la viabilidad celular.

Si bien DctPQM es el principal sistema transportador de C4-DCB en *R. sphaeroides*, en su ausencia y después de 30 horas de incubación se aislaron mutantes capaces de crecer heterotróficamente usando estas fuentes de carbono. Estas cepas supresoras son independientes del sistema DctSR ya que en cultivos de la cepa VS4 ($\Delta dctPQM \Delta dctSR$) incapaces de crecer con ácido succínico o con ácido málico como fuentes de carbono, también presentan un crecimiento exponencial acelerado después de aproximadamente 20 horas de incubación (datos no mostrados). Aún no han sido identificadas las mutaciones responsables de este cambio en el fenotipo, pero éstas podrían estar relacionadas con la modificación de la especificidad y/o con los niveles de expresión de alguno de los homólogos de familias transportadoras de C4-DCB codificados en el genoma de *R. sphaeroides* como DauA, o algunos de los transportadores de la familia TTT (Tabla 10) o de los otros sistemas tipo TRAP (Tabla 11). En nuestro análisis inicial del perfil de transcripción hecho por Arai y colaboradores (2008) en la cepa 2.4.1, los productos de estos genes tenían pocas probabilidades de ser transportadores activos de C4-DCB debido a su baja expresión tanto en el crecimiento fotoheterotrófico como en el heterotrófico con ácido succínico como fuente de carbono, por lo tanto, queda por identificar la mutación responsable del fenotipo en estas cepas supresoras.

De acuerdo con Vermeglio y colaboradores (2004) el crecimiento fotosintético es el óptimo para *R. sphaeroides*, sin embargo, la alternancia entre el crecimiento fotoheterotrófico y heterotrófico es necesaria para disipar los equivalentes reducidos. Además, *R. sphaeroides* cuenta con estrategias de motilidad que le permiten desplazarse a través de la columna de agua (Hernandez-Valle *et al.*, 2017) lo que implica un cambio en la concentración de oxígeno (principal factor en la regulación de la expresión génica) y de luz que podrían coadyuvar a

realizar ajustes en el metabolismo y en el balance energético. Además, en condiciones anaeróbicas, la bacteria tiene la capacidad de fijar CO₂ y esto ayuda también a evitar el exceso de electrones en la poza de quinonas (Dubbs & Tabita, 2004; McIntosh *et al.*, 2019; Vermeaglio *et al.*, 2004).

Nuestros datos muestran que en *R. sphaeroides*, la reducción de la expresión de *dctPQM* durante el crecimiento fotoheterotrófico es requerida, posiblemente, para disminuir el transporte de C₄-DCB evitando que la poza de quinonas se sature por el metabolismo central de carbono, contribuyendo así a que se mantenga un flujo continuo durante la cadena de transporte de electrones, necesario para la producción de energía. Para mantener esta coordinación del transporte y metabolismo se establecería el circuito de regulación donde, en crecimiento fotoheterotrófico DctR contribuye a la disminución de la expresión de *dctSR* y consecuentemente a la de *dctPQM*, lo que también reduciría el nivel de activación del sistema DctSR. La disminución de la transcripción de *dctPQM* durante la fotosíntesis se observa en los resultados del perfil transcriptómico global hecho por Arai y colaboradores (2008) durante la transición del metabolismo fotosintético al respiratorio, pero, en ese trabajo no se ahondo sobre las implicaciones fisiológicas de esta reducción de la expresión de este transportador.

Para cultivar a *R. sphaeroides* han sido también usados medios como el número 27 de DSMZ (https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium27.pdf) o el de Pfennig (Eprintsev *et al.*, 2009), en los que además de succinato de sodio (8 mM) se adicionan entre 0.1 y 0.3 g de extracto de levadura. Sin embargo, son los medios mínimos los que predominan, y en ellos la glucosa, los casaminoácidos o C₄-DCB como succinato, malato o fumarato suelen ser adicionados independientemente como únicas fuentes de carbono (Jeziore-Sassoon *et al.*, 1998; Siström, 1960). El efecto sobre el crecimiento al mezclar dos de estas fuentes de carbono ha sido estudiado en las BFPNS *R. capsulatus* y en *R. rubrum*; en ambas especies se encontró que el consumo de las fuentes es simultáneo, por lo menos en las primeras 20 horas (Grammel *et al.*, 2003). En *R. capsulatus* cuando se combinan malato con glucosa se observa que las células aceleran su tiempo de duplicación y además los cultivos presentan un mayor rendimiento (Stahl & Sojka, 1973).

En *R. sphaeroides*, cuando se combinaron las fuentes de carbono ácido succínico y casaminoácidos también se obtiene una ligera mejora en el rendimiento celular y una

aceleración del tiempo de duplicación, pero no se observó una curva bifásica (anexo 3), lo que sugiere que estos compuestos podrían estar siendo consumidos simultáneamente, lo cual no se ha demostrado experimentalmente. Si bien el combinar dos fuentes de carbono nos permitió obtener el crecimiento celular adecuado para hacer una comparación entre las cepas que de otro modo no crecerían con solo ácido succínico adicionado, también se observó que en algunos ensayos la adición de casaminoácidos, además del succínico, disminuyó la actividad del promotor *dctPQM*. Hay que considerar que los casaminoácidos son una mezcla heterogénea de aminoácidos derivados de la hidrólisis de la caseína bovina, en donde el ácido aspártico, otro C4-DCB, se encuentra en ínfimas concentraciones (aproximadamente en 0.08 pmoles) y se tiene registrado que no compite por el mismo transportador que el ácido succínico, el málico o el fumárico (Gibson, 1975). Además, el medio mínimo SistroM tiene otras fuentes de carbono como los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, presentes en muy bajas concentraciones como para considerarse importantes (0.3 mM y 0.67 mM, respectivamente). Previamente se hizo una curva de crecimiento con solo estas fuentes de carbono, pero la concentración en la que se encuentran en el medio no es suficiente para mantener la viabilidad celular (datos no mostrados). Debido a esto, habría que considerar que otros factores fisiológicos puedan estar interviniendo para explicar la reducción de la actividad del promotor *dctPQM*, por ejemplo, se podrían estar activando los reguladores de los transportadores de los otros aminoácidos presentes en la mezcla de los casaminoácidos, cuyos efectos podrían estar afectando directa o indirectamente la transcripción de *dctPQM*.

Otros mecanismos regulatorios podrían estar modulando la expresión de *dctPQM*, directa o indirectamente a través de DctSR. Por ejemplo, en *R. sphaeroides* se ha identificado que el RNA pequeño no codificante, SorY, regula negativamente la expresión de la subunidad periplásmica (TakP) de un transportador tipo TRAP de un alfa-cetoácido, al unirse directamente al RNA mensajero de *takP* en respuesta a la exposición al estrés fotooxidativo y a otras condiciones de estrés como el calor, la presencia de sales o de CdCl₂. Como producto de esta reducción en la expresión de TakP hay una disminución del flujo metabólico de intermediarios del ciclo TCA y un incremento en la producción de NADPH que protege contra el estrés oxidativo (Adnan *et al.*, 2015). Este control de un sistema transportador para ajustar la formación de NADH en el ciclo del TCA, indica que existen formas complejas en las que se ajusta la expresión de los transportadores de sustratos del TCA.

En *R. sphaeroides* también observamos que entre más tardía la etapa de crecimiento en la que se tomaban los extractos celulares, menor era la actividad promotora de *dctPQM* (datos no mostrados). Anteriormente, se reportó la disminución de la transcripción de *dctPQM* durante el periodo de adaptación entre la fase exponencial y la fase estacionaria de *R. sphaeroides* 2. 4. 1 durante el crecimiento heterotrófico con ácido málico como fuente de carbono (McIntosh *et al.*, 2019). Esta reducción se atribuyó a una respuesta a las condiciones ambientales, ya que no se identificó la intervención de algún regulador similar a RpoS, participante en la adaptación a la fase estacionaria en otras bacterias como *E. coli* (Battesti *et al.*, 2011). Al parecer CceR y AkgK, los reguladores maestros del metabolismo central de carbono y de genes relacionados con el transporte o utilización de las fuentes de carbono, el transporte de electrones y el metabolismo energético de *R. sphaeroides* no controlan la expresión de *dctPQM*, ya que en el transcriptoma y en los microarreglos donde se comparó la expresión de genes en la cepa 2. 4. 1 y en la mutante $\Delta cceR \Delta akgK$ no se encontró cambio en la expresión de *dctP* ni de *dctSR* (Imam *et al.*, 2015).

En cuanto a la percepción de la presencia de C4-DCB en el medio, se ha comprobado cristalográficamente que cinasas como DctB y DcuS pueden unir directamente el ligando a su dominio periplásmico (Cheung & Hendrickson, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Sin embargo, en el análisis de la predicción de la estructura secundaria y terciaria del dominio periplásmico de DctS no se identificaron los residuos necesarios para la coordinación de los grupos carboxilo del ligando, por lo que se propone que los C4-DCB no se unen directamente a DctS, sin embargo, esto debe descartarse o confirmarse experimentalmente. La ausencia de un sitio de unión del ligando en el dominio periplásmico de DctS fue indicativo de que la percepción de la señal podría estar llevándose a cabo de forma indirecta, lo que nos llevó a explorar y confirmar el papel del sistema transportador de C4-DCB, particularmente de DctP, en la vía de señalización del sistema DctSR en *R. sphaeroides*.

La participación de las proteínas de unión a ligando en la vía de señalización que controla la expresión del mismo sistema transportador ha sido previamente descrita para algunas familias de transportadores, uno de los ejemplos mejor estudiados es la proteína de unión a ligando del transportador de citrato BctCBA de *Bordetella pertussis*. En este transportador de la familia de transportadores de ácidos tricarbóxicos (TTT), la subunidad periplásmica BctC une citrato

y media el importe de este ligando a través BctAB, además, de que activa a la cinasa de histidina BctD que en respuesta estimula la expresión del operón *bctCAB* vía el regulador de respuesta BctE (Antoine *et al.*, 2005). Este mecanismo es similar al propuesto aquí para DctPQM de *R. sphaeroides*, sin embargo, entre ambas familias de transportadores (TTT y TRAP) no hay similitud en la secuencia de los pares funcionales, aunque las SBP si comparten una estructura terciaria similar (Antoine *et al.*, 2003; Berntsson *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2010; Winnen *et al.*, 2003). En cuanto a los sistemas tipo TRAP, la participación de la subunidad P en la transducción de señales fue demostrado en *B. subtilis*. En esta especie la subunidad P (DctB) solo funciona como cosensor de los C4-DCB y el transporte de estos compuestos es llevado a cabo por la proteína DctA. (Asai *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2014; Uden *et al.*, 2016a).

Este trabajo sobre DctPQM de *R. sphaeroides*, es el primero que demuestra la bifuncionalidad de la subunidad P (periplásmica) de un sistema transportador tipo TRAP, la cual es indispensable para el transporte del ligando y como parte de la vía de regulación de la expresión de los genes del transportador.

Entre los aspectos que quedan pendientes por estudiar destacan el evaluar si hay interacción directa entre DctP y la cinasa DctS y, posteriormente, determinar la naturaleza de la interacción proteína-proteína entre DctP y DctS y también entre DctP y DctQM, dentro de lo cual esta identificar cuáles son los residuos responsables de dicha interacción, además, de las afinidades entre estas proteínas en presencia y ausencia del ligando. Así como si hay competencia entre DctS y DctQM por DctP-C4DCB, lo que ayudaría a clarificar si los componentes membranales del sistema transportador pueden también modular la activación de DctS. Porque, como se observó en la gráfica de la figura 25, en la cepa AM1 pIND_dctP en presencia y ausencia del inductor (IPTG) la actividad del promotor no varió, además, de que en el Western blot se observa una acumulación de DctP similar en esta cepa en ambas condiciones, lo que sugiere que hay un mecanismo que limita la expresión del transportador aún en presencia del ligando.

Con anterioridad se señaló que en *E coli*, transportadores como DctB y DctA en su extremo C-terminal tienen una hélice anfipática formada por los últimos 50 residuos, esta hélice interacciona con los motivos PAS citoplásmicos de DcuS. Al hacer un análisis de la predicción

de la estructura de DctQ de *R. sphaeroides*, se encuentran también en el extremo C-terminal 54 residuos (con un 14 % de identidad con la misma región de DctA y DcuB) que no pertenecen a las hélices transmembranales, pero en la predicción de la estructura secundaria, no se reconoce la formación de una hélice anfipática (anexo 7). Valdría la pena ahondar sobre el papel de esta región de ~50 residuos de DctQ y valorar si tiene alguna función en la regulación de la actividad de DctS.

Conclusiones

- DctPQM es el principal sistema transportador de ácido succínico en *R. sphaeroides*.
- DctR incrementa la expresión del operón *dctPQM*.
- El complejo DctP-succínico activa al sistema de dos componentes DctSR.
- La expresión de *dctSR* es independiente de DctR en crecimiento heterotrófico.
- DctR controla negativamente la expresión de *dctSR* en crecimiento fotoheterotrófico.
- DctR se une directamente a la región promotora de *dctPQM*.

Perspectivas

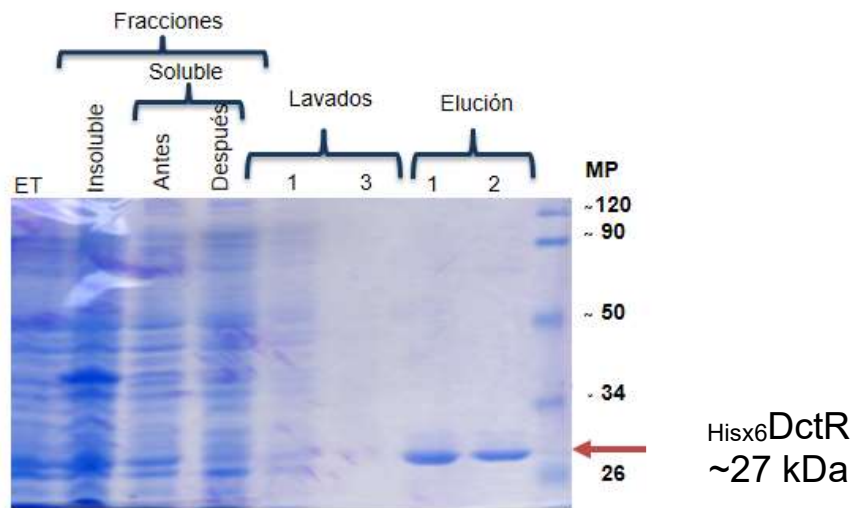
- Analizar la interacción de DctS con DctP-succ en términos de afinidad, así como los aminoácidos involucrados en dicha interacción.
- Encontrar las mutaciones responsables del crecimiento en ácido succínico de las cepas supresoras de VS1.
- Confirmar experimentalmente el motivo de unión de DctR en la región promotora del operón *dctPQM*.
- Determinar si DctR en su estado desfosforilado se puede unir a su motivo de unión.
- Determinar si hay un regulón de DctR.
- Determinar si la transcripción de *dctSR* se encuentra regulada.

Anexos

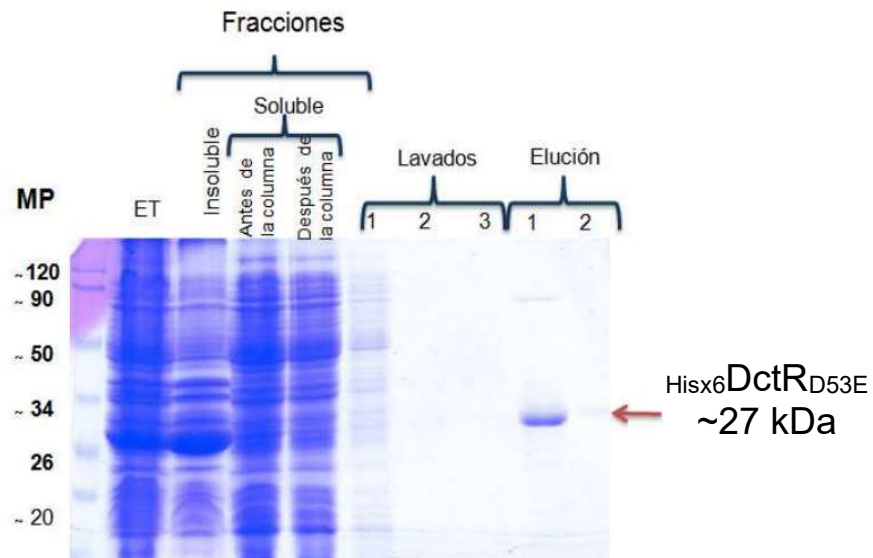
1. SDS-PAGE de la sobreexpresión y de las diferentes fracciones del proceso de purificación de His₆DctR, His₆DctR_{D53E} y His₆DctP

Geles de acrilamida- bisacrilamida (30 -0.8 %). El gel concentrador al 4 % y el gel separador al 12 %.

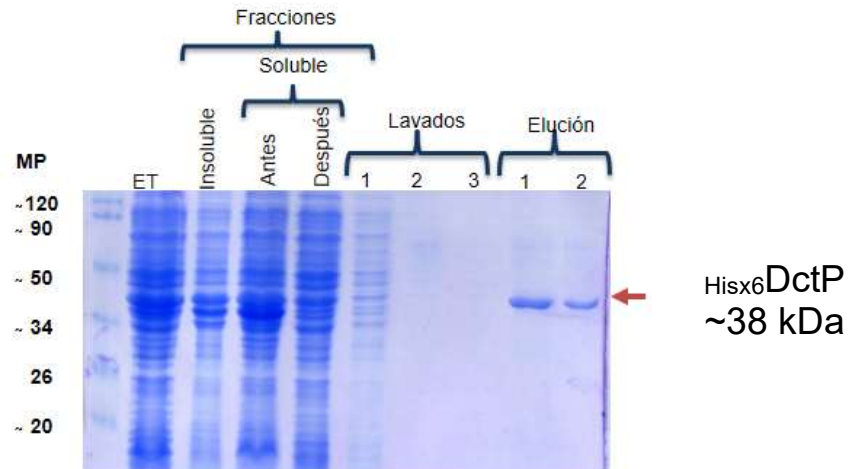
A)



B)

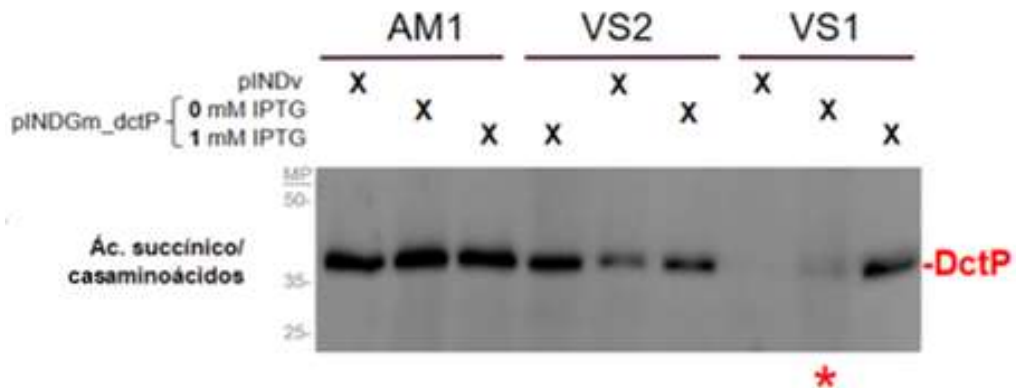


c)

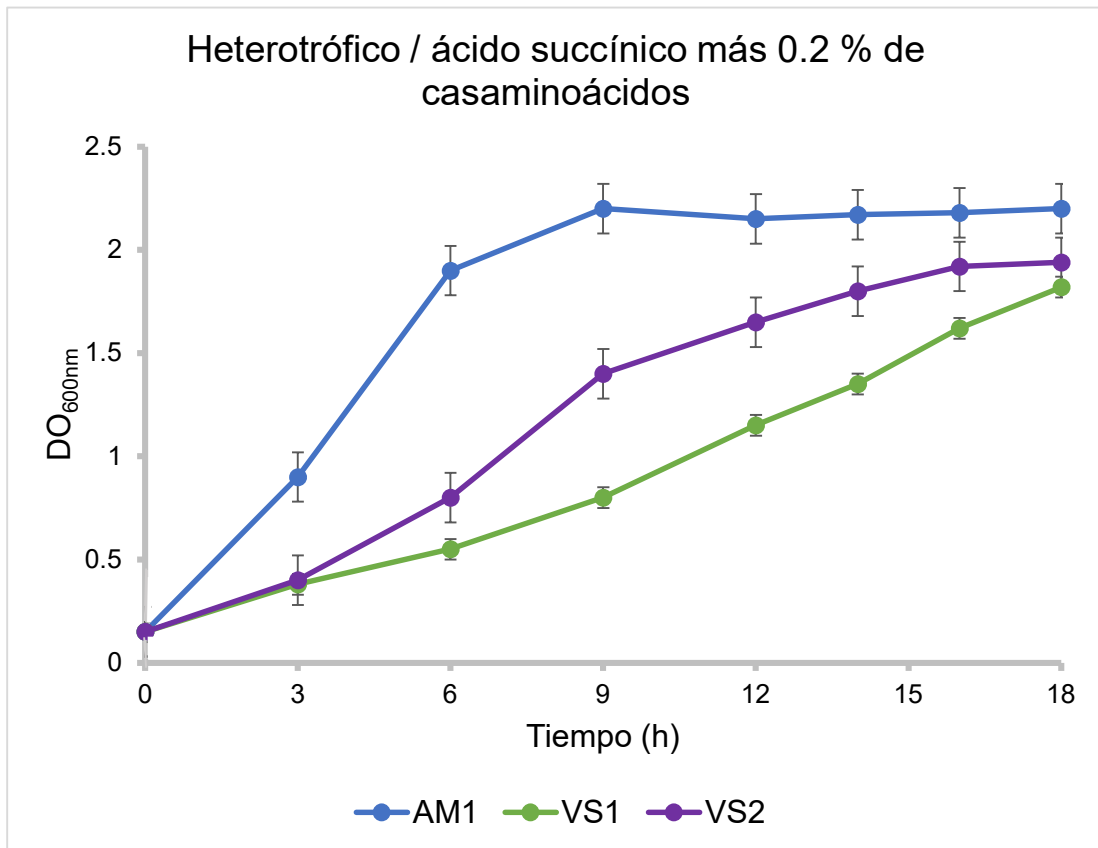


2. Transcripción fuga del plásmido pINDGm_dctPQM

Nótese la ligera señal de la inmunodetección de DctP en el extracto total de VS1 pINDGm_dctP sin la adición del inductor IPTG (carril resaltado con un asterisco rojo).



3. Curva de crecimiento de AM1, VS1 y VS2 en condiciones heterotróficas en MMS con 34 mM de ácido succínico más 0.2 % de casaminoácidos.



4. Alineamiento de las secuencias de algunas cinasas de histidina relacionadas con la regulación de la expresión de sistemas transportadores de C4-DCB

```

1          *          20          *          40          *          60          *          80
DcuS : ---MRHSLHYRMLRK-----RPMKLSITVILMVSAVLESVLLVHVHLLYFSQI-----SDMTRD : 50
DctS : ---VEERTGRQAGAR-----FSEPWALDPPADFRGRVDLLSIMPVVAIVALVALVAASVWIAGRSETECIRT : 63
DctB : MPFVVMCGFPHRSAGVLCENMHNVRMVKLEAF--ATDEHALRSFARRSWI--VEFAVALV-LLAAGLLLRDYGRSCALA : 75

          *          100         *          120         *          140         *          160
DcuS : GLANKALAVARTLADSPEIRCGIQKKAQESGIQAIABAV--RKRN-----DILFIVVTDMQ-SLRYSHPPEA----- : 113
DctS : KLATDALWVECTLRFQLSVDEEDMLARLGLDEAGGTAPAVLEPARARAHIAANPEILSIVWHDAAGGIRRAVEGE---ADTR : 140
DctB : GLAGQS-----RIDASLRASLI-----RAVVE-RCRA-----LHLVIADDA-AIRGAILSEDMQSLDR : 126

          *          180         *          200         *          220         *          240
DcuS : --QRIGQPFKGGDI-----LKALNGEENVAINRGFLAQLRVFTPIYDENEKQIGVVA----- : 164
DctS : ADEELAAQLFRAEARARFVYALMDGQTVTNGLRP-CGSDEVITATVSIPLMERHIPWWIAEQYAVWLLIDGSDSFRARRS : 219
DctB : INRKLLEALATSAEA---AVIYLIDRSGVAVAASNWCEPSTSFVGNDYAFRDYFRFAVRDGMAEHFAMGTVSKRPGIYI--S : 201

          *          260         *          280         *          300         *          320
DcuS : -----IGLELSRVITQCINDSRWSIIWSVLFGMLVGLICITQILVKVLKKILFGLFPEYEISTLFEQR- : 224
DctS : RGTPEPEEGSHSISFDPLLEGAVLRITSYECA-APPAR--ALLPAATAGIAAFALLIALLALYRNACRRRAAEIIRINE--- : 293
DctB : RRVDDGPGGE-----LGVIVAKLEEDVEADWQA--SGKPAYVTDRRGIVLITSLPSWFMTTKPIAEDRIAPIRE : 269

          *          340         *          360         *          380         *          400
DcuS : -----QAMLCOSIKEGVAVVDRGEVTLINDAAQELLNRYKSCDDEKLSTLHSHWSQVVDVVS----- : 280
DctS : -----EMAFR-----FSMEESITVGLRAKDHACRVLYVNSAFCKLVGNNAEDLVGHDCPMYPWAPDRTEET----- : 354
DctB : SLQFGDAPLLFLPFRKIEARPDGSSTLDALPGLSTAAFLRVEI-MVPSTNWELEQLSPLNAPLAAGAREACLITLAAALV : 348

          *          420         *          440         *          460         *          480
DcuS : --EVLRDGTFRRDEEITL-----KRLRLLINTVPRSN-----GVIIICAISTFRKTEVRKLMQRIL----- : 334
DctS : -----LRRQRALAVGGAEPQAFETFRFRSDGTEIDVGVYEAPLIDAKGMHRGWMGSIIDITEARRAARLARECEES : 425
DctB : PLLATAALLLRRRCVVMARSA-----EERLAF-NALEASVEERTRDI----RMARDRIET--EIAADHRQCTTEKIQAVQCD : 416

          *          500         *          520         *          540         *          560
DcuS : ---LGLVNYADALRERSHDFMKNLHVILG-----LLEL-ksyKQLEDYILKfANNYQEPFISLIGKIKSPVIAG-FL : 401
DctS : LARTGRILVILGEMASTLAHELNOPLAATASVYAGAANILRQBRADPALLSSATAKISHQADRAGCIIIRRIQDLVRRREPR : 505
DctB : LVQANRLAALLGQVAAGVAHEINQPVATIRAYADNARTFLH--RGQTITAENMESIAELTERVCAITDELRRFRKGFHFA : 494

          *          580         *          600         *          620         *          640
DcuS : ISKINRATDL-GHTLIINSES-----CLEDSG--SEDQVATLITTLIGNLIENALEALGPEPG-GEISVTLHYRHGW : 468
DctS : FSALDLATVVRVRETAGFLEADARVVRVAVVVAAPL-VIADRILLEQLLINLMRNGIEAMGEAGAVDALTVSLEPGPAR : 584
DctB : AGPTAKEVVEGALMLLRSRFAGRMDA-RIIDLPEPDGLQALGNRIRLEQVLINLLQNALEAIGDSED-GAICVRCVTEAAGG : 573

          *          660         *          680         *          700         *
DcuS : LHCEVNDGPGIAPDKIHLEFDKGVSTKGSERGVGLAVKQCVENLGGSIAVESEPPIFTQCFVCIIPWDGERSNR-- : 543
DctS : AVIEVALRGPPIAPEVALRLFLAFTSTKAEANGIGLNICRIIVEMHRGRLLTHRPREGGTVFVALPAAAPPEGVAEE : 661
DctB : IALTVDNNGPGIADVREELTFENTSKEDGLGLGLAISKEIVSDYGGTIEVESGES-GTIFETINIKKA----- : 641

```

Alineamiento de la secuencia de DcuS de *E. coli*, DctB de *S. meliloti* y de DctS de *R. sphaeroides*. Entre DcuS y DctS hay 20 % de identidad y entre DctB y DctS se presenta un 24 % de identidad.

5. Secuencias de la región intercistronica *dcts-dctp* analizadas en MEME

1 >*Rhodobacter sphaeroides*

CCGTCCTCCCTCGCGCCGCCCGCCTGCGACAAGCTGTCGTCCCTGCGGCCCTTGC GGAAACCCACA
ATAGCGGCAGGCCGTGCGACTGGCAAGGAAGGGCAGGACCGCCGGGAGGGCGGCACAGAGGAGGA
TACCC

2 >*Azospirillum lipoferum* 4B

CCGTCCTCCCTCGCGCCGCCCGCCTGCGACAAGCTGTCGTCCCTGCGGCCCTTGC GGAAACCCACA
ATAGCGGCAGGCCGTGCGACTGGCAAGGAAGGGCAGGACCGGAGGATCGACACGAAAGTGTGGAGG
ACGACGACGATGGGACCGGACGAAAGTGGGACAGGCCGACTCTGCGGATATCCACAATAGCCGCAATT
CGCCGGATCATGAACAATGCGCAACAAGTTCAAGGCGGGACATTCCGCCACGCGGATAATCAACACCAG
AGGGGAACGCACCG

3 >*Herbaspirillum seropedicae* SmR1

GACGCCGCCAGTGTAGCGGCCGTGCCGGGCTTGC GCCAGCATCCCGGTTCGATGGGAATGCCAGCCCG
TGAGACCTGGGGACATTGTGGTTAACCACACTTGCCCGTTTTGGTGATGCTAGGCAAAATGCGCCGGC
ATTCGTGGACCGCGCCAGTTCCAATAATAATTAGAACCATTTCATAAATAGGCGTGAGATGCGTTCTGC
CCAGAAAGGGCGCTGGCAAGGCGCGCAGCGTCTGTGGCGGTGCCACACGCAAGGAGCGCAACGC
GGCAGCGCCCTTTCTGGGCAGAACC CGGAGGGAGCGGCCCTTTGGGCGAATTGCTGCGTTACGAAT
TTGGGTCAAGACGCCAGTCTTGACCCAAATTGCGCCCTTGCACTTCATCCCAAACGGGACTCGCTCGC
ACTCACGCCTATTTATGAAATGGGTTCTAAGAAAATCCAATAAACGATTTACACCTCACTGGGGAGACAA
GC

4 >*Azoarcus* sp. BH72

CGGCGTGAAAGGGCATGTTGCGCCGCAAGTATGCGGACGCGATGGCATAACCTGTTTGGCGTAAGTTGG
TTCTTGGCGACTTCCACAATAGCAGCTGCGATCGGACGGGTTTCGATACTTGTGAATACTTCGGCAGCC
CTTCCGCTGTCCGGGTGTATCCGGCAACACCGCAGGTAGCGCCGGATCAATAAGCAGTCAAAGCCAGA
TTCTTCATCCGGAGGAGAGACTC

5 >*Rhodobacter capsulatus*

GCTTTGAAATGGCACATTCCTCCCGTTTCGTTTGGTTCATAACATGTCTTCCGATTGCGGAAAGCCGCAATA
GCGTTGCGCAAGATTCTTGC GCATGAAAGCCGCGGCCCGCCGTGGAGAGCGGGAACCGGAGGAGAAT
CAC

6 >*Magnetospirillum* sp. XM-1

GGGTCTTTCTCTTGTGGATCACCACAATGGCCGAGCCTTGGCCCGATTCTATAGTAGTCTGGAATA
GCCTGATCTACAGGCATCTTGGGAGGAAATATC

7 >*Herminiimonas arsenicoxydans*

AAATAGCTAATGGAAAACCCGTCTGTCAAATGCCGGCGACGGATAGTCGTGAATCTTCATGTAATAGAT
GTGGCATGCTAAGCAACAAGACTGCGGTTCTCGATGCAGTCGGCCTGTTCTGCGTCGTGGTGCGGTTA
TCCACACTTGCGGAAAATTGAATGACTGCGCATAGTAACGCCAAAATCAAATTTCCCGACTGC
GCA

8 >*Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1

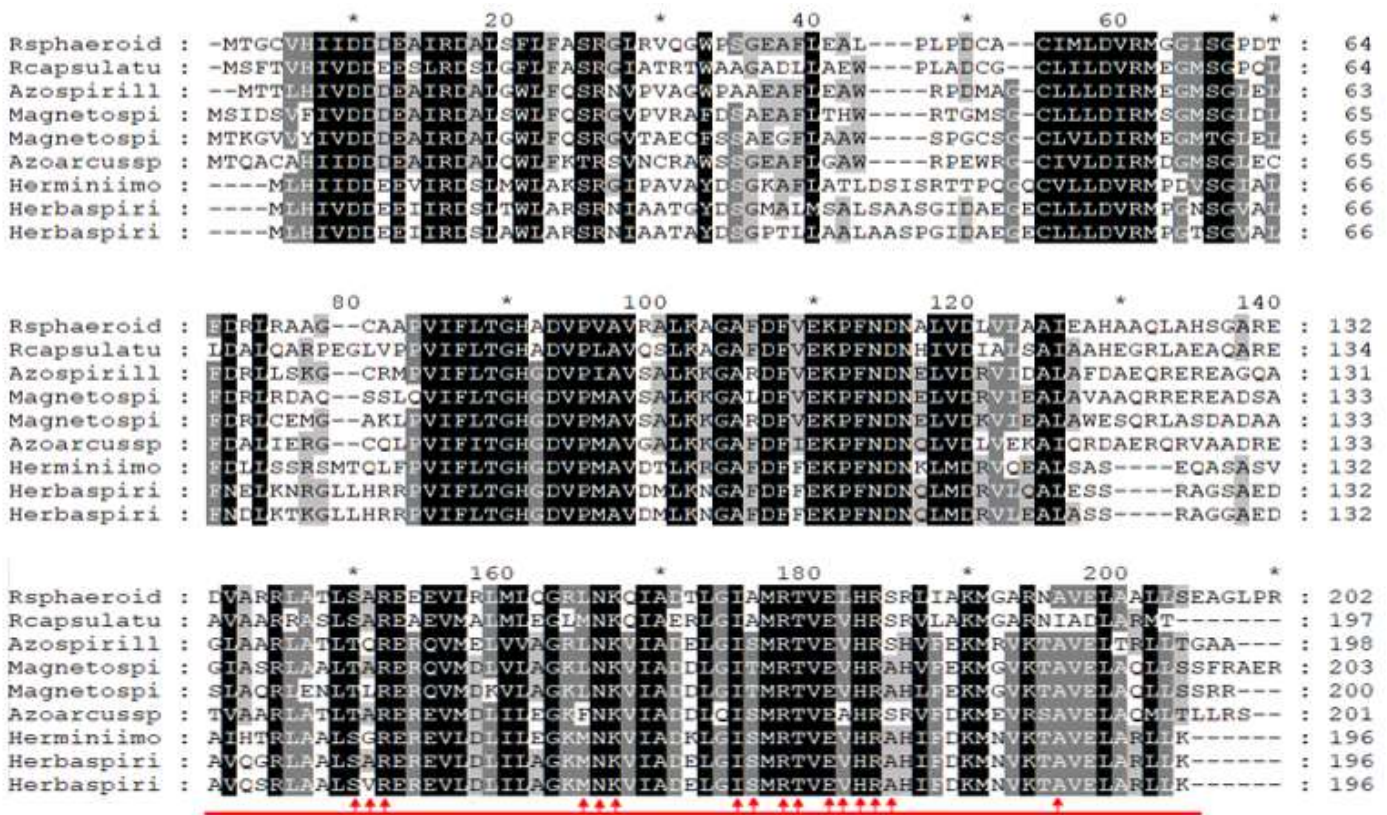
GACGCCGCCAGTGTAGCGGCCACCCAGGCCTTGC GCCAGCATCCCATGCATCGGGAAGTTGATGCTGG
GAACATTGTGGTTATCCACAGTTGCCCGATTGGTTTGGCCGCGCAGAATTCGCAGGCACAACTGGT
CCGCGCCAAGGCCAGCCACATTTAAAAGTATAAATAAACGTTTTACACCTCAC TGGGGAGACAAGC

9 >*Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 v2

CCCTGCATGATGCTCATTGACGGATATCCACAATAGCTCAGTGAACGAAAGTTTCTGACAATCCGCCGG
ATAAAGCTTACCAAACCTTCTCGGGAGGAGAATCCCC

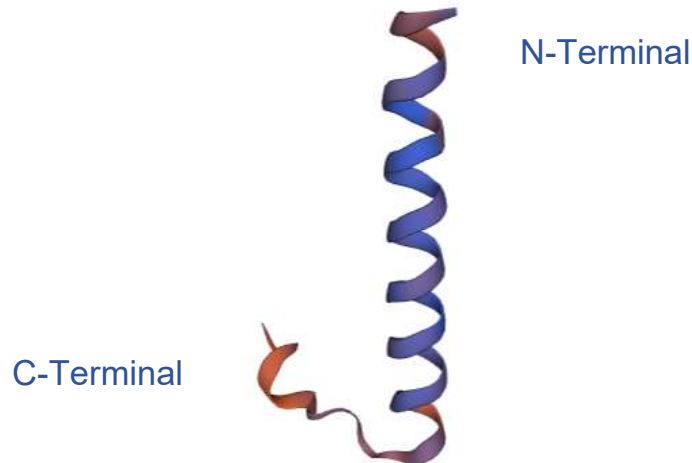
6. Alineamiento de la secuencia de homólogos de DctR de las especies usadas para predecir el motivo de unión de DctR en la región promotora *dctS-P*

Secuencia de DctR de cada una de las especies en las que se encontró conservada la sintenia *dctSR-dctPQM*, cuya región intercistrónica *dctS-dctP* fue usada para predecir el motivo de unión de DctR. Con la barra roja se indica el dominio de unión a DNA y con las flechas rojas se resaltan los residuos que, de acuerdo con la predicción hecha en InterPro y en el servidor NCBI, estarían directamente involucrados en la unión al DNA.



7. Alineamiento de la región de 50 aminoácidos en el C-terminal de DctA y DctQ

Modelo de la hélice anfipática formada por los últimos 50 residuos del extremo C-terminal de DctA. El templado con un 35.14 % de identidad y un TM-score de 0.78, fue un transportador simporte de glutamato de la familia SDF (5e9s.1.A)



Entre los últimos 53 residuos del extremo C-terminal de DctA de *E. coli* y los últimos 54 residuos del mismo extremo de DctQ de *R. sphaeroides* hay un 14 % de identidad.

	Identities 8/56(14%)	Positives 14/56(25%)	Gaps 5/56(8%)
DctA C-terminal	DRFMSEARALT---	NLVGNGVATIVVAKWKELDHKKLDDVLNNRAPDGKTHELSS	53
	+ AR + G+	+ + L L L R K +	
DctQ C-terminal	QVAVIFARTGELPHHDHGHVEGVDTED	EGIDVLGSTFLKSPLTPRDLVEKPKD--E	54

No se encontró ningún molde que tuviera coincidencia con la secuencia de los últimos 54 residuos del extremo C-terminal de la proteína DctQ, por lo tanto, no se puede predecir si se forma una hélice anfipática o no.

Referencias Bibliográficas

- Adnan, F., Weber, L., & Klug, G. (2015). The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biology*, *12*(5), 569–579.
- Akiyama, N., Takeda, K., & Miki, K. (2009). Crystal Structure of a Periplasmic Substrate-Binding Protein in Complex with Calcium Lactate. *Journal of Molecular Biology*, *392*(3), 559–565.
- Akram, M. (2014). Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *68*(3), 475–478. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>
- Aliverdieva, D. a., & Mamaev, D. V. (2009). Molecular characteristics of transporters of C4-dicarboxylates and mechanism of translocation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, *45*(3), 323–339. <https://doi.org/10.1134/S0022093009030016>
- Allen, S., Zaleski, A., Johnston, J. W., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (2005). Novel sialic acid transporter of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, *73*(9), 5291–5300.
- Altschul, S., Madden, T. L., A. Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, *25*(17), 3389–3402.
- Ambulos, N. P., Smith, T., Mulbry, W., & Lovett, P. S. (1990). CUG as a mutant start codon for cat-86 and xylE in *Bacillus subtilis*. *Gene*, *94*(1), 125–128. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90478-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90478-A)
- Antoine, R., Huvent, I., Chemlal, K., Deray, I., Raze, D., Loch, C., & Jacob-Dubuisson, F. (2005). The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *Journal of Molecular Biology*, *351*(4), 799–809.
- Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., Drobecq, H., Willery, E., Lesjean, S., & Loch, C. (2003). Overrepresentation of a gene family encoding extracytoplasmic solute receptors in *Bordetella*. *Journal of Bacteriology*, *185*(4), 1470–1474. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1470-1474.2003>
- Aono, S. (2013). The Dos Family of Globin-Related Sensors Using PAS Domains to Accommodate Haem Acting as the Active Site for Sensing External Signals. In *Advances in Microbial Physiology* (1st ed., Vol. 63). Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Arai, H., Roh, J. H., Eraso, J. M., & Kaplan, S. (2013). Transcriptome response to nitrosative stress in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *77*(1), 111–118.
- Arai, H., Roh, J. H., & Kaplan, S. (2008). Transcriptome dynamics during the transition from anaerobic photosynthesis to aerobic respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, *190*(1), 286–299. <https://doi.org/10.1128/JB.01375-07>
- Asai, K., Baik, S. H., Kasahara, Y., Moriya, S., & Ogasawara, N. (2000a). Regulation of the transport system for C4-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, *146*(2), 263–271.
- Asai, K., Baik, S., Kasahara, Y., Moriya, S., & Ogasawara, N. (2000b). Regulation of the transport system for C 4 -dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Construction, May*, 263–271.
- Attwood, P. V. (2013). Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society Transactions*, *41*(4), 1023–1028. <https://doi.org/10.1042/BST20130019>
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Al., E. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* (J. Wiley (ed.)).
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, *37*(SUPPL. 2), 202–208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bao, K., & Cohen, S. N. (2001). Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes and Development*, *15*(12), 1518–1527.
- Barbieri, C. M., & Stock, A. M. (2008). Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Analytical Biochemistry*, *376*(1), 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.004>
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-Mediated General Stress Response in

-
- Escherichia coli**. *Annu Rev Microbiol*, 65(1), 189–213.
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I., & Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.
- Berntsson, R. P.-A. A., Smits, S. H. J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J. J., & Poolman, B. (2010). A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Letters*, 584(12), 2606–2617. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043>
- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G. A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D. H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., ... Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D354.
- Boyer, H. W., & Rovlland-Dvsooix, D. (1969). A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 41, 459–472.
- Brimacombe, C. A., Ding, H., Johnson, J. A., & Thomas Beatty, J. (2015). Homologues of genetic transformation DNA import genes are required for *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent recipient capability regulated by the response regulator CtrA. *Journal of Bacteriology*, 197(16), 2653–2663. <https://doi.org/10.1128/JB.00332-15>
- Brocker, M., Schaffer, S., Mack, C., & Bott, M. (2009). Citrate utilization by *Corynebacterium glutamicum* is controlled by the CitAB two-component system through positive regulation of the citrate transport genes *citH* and *tctCBA*. *Journal of Bacteriology*, 191(12), 3869–3880.
- Brückner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: Choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00559-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00559-1)
- Brüggemann, C., Denger, K., Cook, A. M., & Ruff, J. (2004). Enzymes and genes of taurine and isethionate dissimilation in *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology*, 150(4), 805–816.
- Buchanan, R. E. (1918). Life Phases in a Bacterial Culture Author. *The Journal of Infectious Diseases*, 23(2), 109–125.
- Chen, D., & Texada, D. E. (2006). Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 10(1), 1–12.
- Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2008). Crystal structures of C4-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30256–30265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805253200>
- Clayton, R., and Sistrom, W. (1978). General Physiology and Ecology of Photosynthetic Bacteria. In W. Clayton, R. and Sistrom (Ed.), *The Photosynthetic Bacteria* (pp. 3–18).
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114.
- Cuneo, M. J., Changela, A., Miklos, A. E., Beese, L. S., Krueger, J. K., & Hellinga, H. W. (2008). Structural analysis of a periplasmic binding protein in the tripartite ATP-independent transporter family reveals a tetrameric assembly that may have a role in ligand transport. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32812–32820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803595200>
- Davies, S. J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S. a, Harrington, V. L., Guest, J. R., & Kelly, D. J. (1999). *Inactivation and Regulation of the Aerobic C 4 -Dicarboxylate Transport (dctA) Gene of Escherichia coli*. 181(18), 5624–5635.
- Davis, J., Donohue, T. J., & Kaplan, S. (1988). Mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 320–329.
- Del Campo, A. M., Ballado, T., De La Mora, J., Poggio, S., Camarena, L., & Dreyfus, G. (2007). Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8397–8401.
- Desai, S. K., & Kenney, L. J. (2016). To -P or Not to -P? Non-canonical activation by two-component response regulators. *Molecular Microbiology*, 00. <https://doi.org/10.1111/mmi.13532>

- Dubbs, J. M., & Tabita, F. R. (2004). Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), 353–376.
- Dufour, Y. S., Kiley, P. J., & Donohue, T. J. (2010). Reconstruction of the core and extended regulons of global transcription factors. *PLoS Genetics*, 6(7), 1–20.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Eisenbach, M. (2015). *Motor Complex of Bacterial Flagella* †. 416(2), 192–207.
- Elbourne, L. D. H., Tetu, S. G., Hassan, K. A., & Paulsen, I. T. (2017). TransportDB 2.0: A database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D320–D324. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1068>
- Eprintsev, A. T., Klimova, M. A., Shikhalieva, K. D., Fedorin, D. N., Dzhaber, M. T., & Kompantseva, E. I. (2009). Features of structural organization and expression regulation of malate dehydrogenase isoforms from *Rhodobacter sphaeroides* strain 2R. *Biochemistry. Biokhimiia*, 74(7), 793–799.
- Felder, C. B., Graul, R. C., Lee, A. Y., Merkle, H. P., & Sadee, W. (1999). The venus flytrap of periplasmic binding proteins: An ancient protein module present in multiple drug receptors. *AAPS PharmSci*, 1(2), 1–20. <https://doi.org/10.1208/ps010202>
- Fischer, M., Hopkins, A. P., Severi, E., Hawkhead, J., Bawdon, D., Watts, A. G., Hubbard, R. E., & Thomas, G. H. (2015). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters use an arginine-mediated selectivity filter for high affinity substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 290(45), jbc.M115.656603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656603>
- Fischer, M., Zhang, Q. Y., Hubbard, R. E., & Thomas, G. H. (2010). Caught in a TRAP: Substrate-binding proteins in secondary transport. *Trends in Microbiology*, 18(10), 471–478.
- Forrest, L. R., Krämer, R., & Ziegler, C. (2011). The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(2), 167–188.
- Forward, J. a., Behrendt, M. C., Wyborn, N. R., Cross, R., & Kelly, D. J. (1997). TRAP transporters: A new family of periplasmic solute transport systems encoded by the dctPQM genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5482–5493.
- Forward, J., Behrendt, M. C., Behrendt, M. C., Wyborn, N. R., Wyborn, N. R., Cross, R., Cross, R., Kelly, D. J., & Kelly, D. J. (1997). TRAP Transporters: a New Family of Periplasmic Solute Transport Systems Encoded by the. *Microbiology*, 179(17), 5482–5493.
- Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4169–4182.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N., & Koonin, E. V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 11–21.
- Giblin, L., Boesten, B., Turk, S., Hooykaas, P., & O'gara, F. (1995). Signal transduction in the *Rhizobium meliloti* dicarboxylic acid transport system. *FEMS Microbiology Letters*, 126(1), 25–30.
- Gibson, J. (1975). Uptake of C₄ dicarboxylates and pyruvate by *Rhodospseudomonas spheroides*. *Journal of Bacteriology*, 123(2), 471–480.
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., Romero, D., Dávalos, A., Lopez, O., Soberon, M., & Romero, D. (2000). Differential regulation of fixN-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel fixL-fixK cascade. *Molecular Plantmicrobe Interactions MPMI*, 13(12), 1283–1292.
- Golby, P., Davies, S., Kelly, D. J., Guest, J. R., & Andrews, S. C. (1999). Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-Dicarboxylates in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1238–1248. <https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1238-1248.1999>
- Golby, P., Kelly, D. J., Guest, J. R., & Andrews, S. C. (1998). Topological analysis of dcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4821–4827.

-
- Gonin, S., Arnoux, P., Pierru, B., Lavergne, J., Alonso, B., Sabaty, M., & Pignol, D. (2007). Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. *BMC Structural Biology*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-11>
- Gordon, G. C., & McKinlay, J. B. (2014). Calvin cycle mutants of photoheterotrophic purple nonsulfur bacteria fail to grow due to an electron imbalance rather than toxic metabolite accumulation. *Journal of Bacteriology*, 196(6), 1231–1237. <https://doi.org/10.1128/JB.01299-13>
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(8), 613–624. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1932>
- Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genetics*, 21(7), 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.05.008>
- Graf, S., Schmieden, D., Tschauner, K., Hunke, S., & Unden, G. (2014). The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C4-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 196(5), 1084–1093. <https://doi.org/10.1128/JB.01154-13>
- Grammann, K., Volke, A., & Kunte, H. J. (2002). New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the Bacteria domain: TRAP transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 3078–3085. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3078-3085.2002>
- Grammel, H., Gilles, E. D., & Ghosh, R. (2003). Microaerophilic Cooperation of Reductive and Oxidative Pathways Allows Maximal Photosynthetic Membrane Biosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6577–6586.
- Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J., & LeBrun, N. E. (2009). Bacterial sensors of oxygen. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.008>
- Hamblin, M. J., Shaw, J. G., Curson, J. P., & Kelly, D. J. (1990). Mutagenesis, cloning and complementation analysis of C4-dicarboxylate transport genes from *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, 4(9), 1567–1574.
- Hamblin, M. J., Shaw, J. G., & Kelly, D. J. (1993). Sequence analysis and interposon mutagenesis of a sensor-kinase (DctS) and response-regulator (DctR) controlling synthesis of the high-affinity C4-dicarboxylate transport system in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 237(1–2), 215–224.
- Happ, H. N., Braatsch, S., Broschek, V., Osterloh, L., & Klug, G. (2005). Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Molecular Microbiology*, 58(3), 903–914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04882.x>
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor (ed.)). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., & Steinbeck, C. (2016). ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1214–D1219.
- He, N., Kawamura, K., Okuzawa, K., Pochanart, P., Liu, Y., Kanaya, Y., & Wang, Z. F. (2014). Diurnal and temporal variations of water-soluble dicarboxylic acids and related compounds in aerosols from the northern vicinity of Beijing: Implication for photochemical aging during atmospheric transport. *Science of the Total Environment*, 499, 154–165.
- Henry, K. K., Ross, W., Myers, K. S., Lemmer, K. C., Vera, J. M., Landick, R., Donohue, T. J., & Gourse, R. L. (2020). A majority of *Rhodobacter sphaeroides* promoters lack a crucial RNA polymerase recognition feature, enabling coordinated transcription activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(47), 29658–29668.
- Hernández-Valle, J. de J. (2016). *Caracterización de los quimiorreceptores McpA y McpB de Rhodobacter sphaeroides: análisis funcional y de expresión*. Tesis. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

-
- Hernandez-Valle, J., Domenzain, C., de la Mora, J., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2017). The master regulators of the Fla1 and Fla2 flagella of *Rhodobacter sphaeroides* control the expression of their cognate cheY proteins. *Journal of Bacteriology*, 199(5).
- Hördt, A., López, M. G., Meier-Kolthoff, J. P., Schleuning, M., Weinhold, L. M., Tindall, B. J., Gronow, S., Kyrpides, N. C., Woyke, T., & Göker, M. (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11(April).
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115–2122.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314.
- Huynh, T. N., Chen, L.-L., & Stewart, V. (2015). Sensor–response regulator interactions in a cross-regulated signal transduction network. *Microbiology*, 161(7), 1504–1515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000092>
- Ikeda, M., Arai, M., Okuno, T., & Shimizu, T. (2003). TMPDB: a database of experimentally-characterized transmembrane topologies. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 406–409.
- Imam, S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2013). Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Systems Biology*, 7(1), 89.
- Imam, S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2015). CceR and AkgR Regulate Central Carbon and Energy Metabolism in. *MBio*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02461-14>
- Imhoff, J.F., Truper, H. G., & Pfennig, N. (1984). Rearrangement of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 340–343.
- Imhoff, Johannes F. (2015). *Rhodobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00862>
- Ind, A. C., Porter, S. L., Brown, M. T., Byles, E. D., De Beyer, J. A., Godfrey, S. A., & Armitage, J. P. (2009). Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6613–6615. <https://doi.org/10.1128/AEM.01587-09>
- Inui, M., Nakata, K., Roh, J. H., Vertès, A. A., & Yukawa, H. (2003). Isolation and molecular characterization of pMG160, a mobilizable cryptic plasmid from *Rhodobacter blasticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 725–733. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.725-733.2003>
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, a., & Uden, G. (2002). C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1553(1–2), 39–56. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00233-X)
- Janausch, I., Kim, O., & Uden, G. (2001). DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: Contribution of diffusion and of alternative carriers. *Archives of Microbiology*, 176(3), 224–230. <https://doi.org/10.1007/s002030100317>
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8447–8451. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8447>
- Jeziore-Sassoon, Y., Hamblin, P. a., Bootle-Wilbraham, C. a., Poole, P. S., & Armitage, J. P. (1998). Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 144(1), 229–239. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-229>
- Jones, H. M., & Gunsalus, R. P. (1987). Regulation of *Escherichia coli* fumarate reductase (frdABCD) operon expression by respiratory electron acceptors and the fnr gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(7), 3340–3349. <https://doi.org/10.1128/jb.169.7.3340-3349.1987>
- Jording, D., Sharma, P. K., Schmidt, R., Engelke, T., Uhde, C., & Pühler, A. (1993). Regulatory aspects

- of the C4-dicarboxylate transport in *Rhizobium meliloti*: Transcriptional activation and dependence on effective symbiosis. *Journal of Plant Physiology*, 141(1), 18–27. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80846-1](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80846-1)
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 429–432. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm256>
- Kang, S., Park, H., Lee, K. J., & Lee, K. H. (2021). Transcription activation of two clusters for exopolysaccharide biosynthesis by phosphorylated DctD in *Vibrio vulnificus*. *Environmental Microbiology*, 23(9), 5364–5377. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15636>
- Karinou, E., Compton, E. L. R., Morel, M., & Javelle, A. (2013). The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C4-dicarboxylic acid transporter. *Molecular Microbiology*, 87(3), 623–640. <https://doi.org/10.1111/mmi.12120>
- Karinou, E., Hoskisson, P. A., Strecker, A., Uden, G., & Javelle, A. (2017). The *E. coli* dicarboxylic acid transporters DauA act as a signal transducer by interacting with the DctA uptake system. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16578-w>
- Karzanov, V. V., & Ivanovsky, R. N. (1980). Sodium-dependent succinate uptake in purple bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. *BBA - Biomembranes*, 598(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90267-9)
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., & Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 70(1), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Kelly, D. J., & Thomas, G. H. (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea [Review]. *FEMS Microbiol.Rev.*, 25, 405–424. [https://doi.org/S0168-6445\(01\)00061-4](https://doi.org/S0168-6445(01)00061-4) [pii]
- Keppen, O. I., Krasil'nikova, E. N., Lebedeva, N. V., & Ivanovskii, R. N. (2013). Comparative study of metabolism of the purple photosynthetic bacteria grown in the light and in the dark under anaerobic and aerobic conditions. *Microbiology (Russian Federation)*, 82(5), 547–553. <https://doi.org/10.1134/S0026261713050056>
- Kiley, P. J., & Kaplan, S. (1988). Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological Reviews*, 52(1), 50–69. <https://doi.org/10.1128/mmbr.52.1.50-69.1988>
- Kim, O. Bin, & Uden, G. (2007). The L-tartrate/succinate antiporter TtdT (YgjE) of L-tartrate fermentation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1597–1603. <https://doi.org/10.1128/JB.01402-06>
- Klamt, S., Grammel, H., Straube, R., Ghosh, R., & Gilles, E. D. (2008). Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria. *Molecular Systems Biology*, 4(156), 156. <https://doi.org/10.1038/msb4100191>
- Kleefeld, A., Ackermann, B., Bauer, J., Krämer, J., & Uden, G. (2009). The fumarate/succinate antiporter DcuB of *Escherichia coli* is a bifunctional protein with sites for regulation of DcuS-dependent gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 265–275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807856200>
- Kleefeld, A., & Uden, G. (2004). C4-Dicarboxylate Degradation in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.5>
- Kneuper, H., Jausch, I. G., Vijayan, V., Zweckstetter, M., Bock, V., Griesinger, C., & Uden, G. (2005). The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20596–20603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502015200>
- Krämer, J., Fischer, J. D., Zientz, E., Vijayan, V., Griesinger, C., Lupas, A., & Uden, G. (2007). Citrate sensing by the C4-dicarboxylate/citrate sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: Binding site and conversion of DcuS to a C 4-dicarboxylate- or citrate-specific sensor. *Journal of Bacteriology*,

- 189(11), 4290–4298. <https://doi.org/10.1128/JB.00168-07>
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>
- Krom, B. P., Warner, J. B., Konings, W. N., & Lolkema, J. S. (2000). Complementary metal ion specificity of the metal-citrate transporters CitM and CitH of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6374–6381. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6374-6381.2000>
- Kuhlmann, S. I., van Schelting, A. C. T., Bienert, R., Kunte, H. J., & Ziegler, C. M. (2008). 1.55 Å Structure of the Ectoine Binding Protein TeaA of the Osmoregulated. *Biochemistry*, 47(Figure 1), 9475–9485.
- Laub, M. T., & Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics*, 41, 121–145. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.042007.170548>
- Lemmer, K. C., Dohnalkov, A. C., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2015). Oxygen-dependent regulation of bacterial lipid production. *Journal of Bacteriology*, 197(9), 1649–1658. <https://doi.org/10.1128/JB.02510-14>
- Lukas, H., Reimann, J., Kim, O. Bin, Grimpo, J., & Uden, G. (2010). Regulation of aerobic and anaerobic D-malate metabolism of *Escherichia coli* by the LysR-type regulator DmlR (YeaT). *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2503–2511. <https://doi.org/10.1128/JB.01665-09>
- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, A., & Kaplan, S. (2007). Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Review of Microbiology*, 61, 283–307. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093402>
- Madigan, M. T. (2003). Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Photosynthesis Research*, 76, 157–171. <https://doi.org/10.1023/A:1024998212684>
- Madigan, M. T., & Gest, H. (1979). Growth of the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* Chemoautotrophically in Darkness with H₂ as the Energy Source. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 137, Issue 1). <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Madigan, M. T., & Jung, D. (2009). The Purple Phototrophic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration. In C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnau, & J. T. Beatty (Eds.), *An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats* (pp. 1–15).
- Mancusso, R., Gregorio, G. G., Liu, Q., & Wang, D. N. (2012). Structure and mechanism of a bacterial sodium-dependent dicarboxylate transporter. *Nature*, 491(7425), 622–626. <https://doi.org/10.1038/nature11542>
- Marinelli, F., Kuhlmann, S. I., Grell, E., Kunte, H. J., Ziegler, C., & Faraldo-Gómez, J. D. (2011). Evidence for an allosteric mechanism of substrate release from membrane-transporter accessory binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49). <https://doi.org/10.1073/pnas.1112534108>
- Marinus, M. G., Carraway, M., Frey, A. Z., Brown, L., & Arraj, J. A. (1983). Insertion mutations in the dam gene of *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics MGG*, 192, 288–289.
- Martinez-Guerrero, C. E., Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G., & Merino, E. (2008). GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 176–180. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn330>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(4), 910–938. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>
- McCleary, W. R., & Stock, J. B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31567–31572.
- McEwan, A. G., Wetzstein, H. G., Ferguson, S. J., & Jackson, J. B. (1985). Periplasmic location of the terminal reductase in trimethylamine N-oxide and dimethylsulphoxide respiration in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *BBA - Bioenergetics*, 806(3), 410–417.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(85\)90248-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90248-8)

- McIntosh, M., Eisenhardt, K., Remes, B., Konzer, A., & Klug, G. (2019). Adaptation of the Alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* to stationary phase. *Environmental Microbiology*, 21(11), 4425–4445. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14809>
- Metcalf, W. W., & Wanner, B. L. (1993). Construction of new β -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene*, 129(1), 17–25. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90691-U](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90691-U)
- Moat, A., Foster, J., & Spector, M. (Eds.). (2002a). Central Pathways of Carbohydrate Metabolism. In *Microbial Physiology* (4th ed., pp. 350–367). Wiley- Liss, Inc.
- Moat, A. G., Foster, J. W., & Spector, M. P. (2002b). *Microbial Physiology in the Genomic Era: a Revolutionary Tale*. 171–193.
- Monzel, C., & Uden, G. (2015). Transmembrane signaling in the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: A long-range piston-type displacement of transmembrane helix 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201507217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507217112>
- Müller, A., Severi, E., Mulligan, C., Watts, A. G., Kelly, D. J., Wilson, K. S., Wilkinson, A. J., & Thomas, G. H. (2006). Conservation of structure and mechanism in primary and secondary transporters exemplified by SiaP, a sialic acid binding virulence factor from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 22212–22222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603463200>
- Mulligan, C., Fischer, M., & Thomas, G. H. (2011). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 68–86. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00236.x>
- Mulligan, C., Kelly, D. J., & Thomas, G. H. (2007). Tripartite ATP-independent periplasmic transporters: Application of a relational database for genome-wide analysis of transporter gene frequency and organization. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12(3–4), 218–226. <https://doi.org/10.1159/000099643>
- Nath, S., & Villadsen, J. (2015). Oxidative phosphorylation revisited. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 429–437. <https://doi.org/10.1002/bit.25492>
- Oh, J. I., & Kaplan, S. (2000). Redox signaling: globalization of gene expression. *Embo J*, 19(16), 4237–4247. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4237>
- Oh, J. I., & Kaplan, S. (2001). Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1116–1123. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02299.x>
- Oshima, T., & Biville, F. (2006). Functional identification of ygiP as a positive regulator of the ttdA-ttdB-ygjE operon. *Microbiology*, 152(7), 2129–2135. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28753-0>
- Pernil, R., Herrero, A., & Flores, E. (2010). A TRAP transporter for pyruvate and other monocarboxylate 2-oxoacids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 6089–6092. <https://doi.org/10.1128/JB.00982-10>
- Peters, A. E., Bavishi, A., Cho, H., & Choudhary, M. (2012). Evolutionary constraints and expression analysis of gene duplications in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *BMC Research Notes*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-192>
- Piepenbreier, H., Fritz, G., & Gebhard, S. (2017). Transporters as information processors in bacterial signalling pathways. *Molecular Microbiology*, 104(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/mmi.13633>
- Podgornaia, A. I., & Laub, M. T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.004>
- Poggio, S., Abreu-Goodger, C., Fabela, S., Osorio, A., Dreyfus, G., Vinuesa, P., & Camarena, L. (2007). A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3208–3216. <https://doi.org/10.1128/JB.01681-06>
- Poggio, S., Osorio, A., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2005). The flagellar hierarchy of *Rhodobacter*

- sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Molecular Microbiology*, 58(4), 969–983. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04900.x>
- Pos, K., Dimroth, P., & Bott, M. (1998). The *Escherichia coli* Citrate Carrier CitT: a Member of a Novel Eubacterial Transporter {...}. *Journal of Bacteriology*, 180(16), 4160–4165.
- Prakash, S., Cooper, G., Singhi, S., & Saier, M. H. (2003). The ion transporter superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1618(1), 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.10.010>
- Quandt, J., & Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15–21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)
- Quintero, M. J., Montesinos, M. L., Herrero, A., & Flores, E. (2001). Identification of genes encoding amino acid permeases by inactivation of selected ORFs from the *Synechocystis* genomic sequence. *Genome Research*, 11(12), 2034–2040. <https://doi.org/10.1101/gr.196301>
- Rabus, R., Jack, D. L., Kelly, D. J., & Saier, M. H. (1999). TRAP transporters: An ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiology*, 145(12), 3431–3445. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-12-3431>
- Remsen, C. (1972). Comparative Subcellular Architecture of Photosynthetic Bacteria. In R. Clayton & W. Sistrom (Eds.), *The Photosynthetic Bacteria* (pp. 31–40). Plenum Press.
- Richardson, D. J., King, G. F., Kelly, D. J., McEwan, A. G., Ferguson, S. J., & Jackson, J. B. (1988). The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Archives of Microbiology*, 150(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/BF00425152>
- Roh, J. H., Smith, W. E., & Kaplan, S. (2004). Effects of oxygen and light intensity on transcriptome expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Redox active gene expression profile. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9146–9155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311608200>
- Rosa, L. T., Bianconi, M. E., Thomas, G. H., & Kelly, D. J. (2018). Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters and Tripartite Tricarboxylate Transporters (TTT): From uptake to pathogenicity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00033>
- Rosa, L. T., Dix, S. R., Rafferty, J. B., & Kelly, D. J. (2019). A New Mechanism for High-Affinity Uptake of C4-Dicarboxylates in Bacteria Revealed by the Structure of *Rhodopseudomonas palustris* MatC (RPA3494), a Periplasmic Binding Protein of the Tripartite Tricarboxylate Transporter (TTT) Family. *Journal of Molecular Biology*, 431(xxxx), 351–367. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.11.016>
- Sá-Pessoa, J., Paiva, S., Ribas, D., Silva, I. J., Viegas, S. C., Arraiano, C. M., & Casal, M. (2013). SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 454(3), 585–589. <https://doi.org/10.1042/BJ20130412>
- Saier, M. H. (2000). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(2), 354–411. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.2.354-411.2000>
- Saier, Milton H., Reddy, V. S., Tsu, B. V., Ahmed, M. S., Li, C., & Moreno-Hagelsieb, G. (2016). The Transporter Classification Database (TCDB): Recent advances. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D372–D379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1103>
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C. S. H. Laboratories (Ed.); 3rd ed.). Oxford University Press.
- Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaefer, V., Hilker, R., Søgaard-Andersen, L., & Becker, A. (2015). Cyclic Di-GMP Regulates Multiple Cellular Functions in the Symbiotic Alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 198(3), 521–535. <https://doi.org/10.1128/JB.00795-15>
- Scheu, P. D., Witan, J., Rauschmeier, M., Graf, S., Liao, Y. F., Ebert-Jung, A., Basché, T., Erker, W., &

- Uden, G. (2012). CitA/CitB two-component system regulating citrate fermentation in *Escherichia coli* and its relation to the DcuS/DcuR system In vivo. *Journal of Bacteriology*, *194*(3), 636–645. <https://doi.org/10.1128/JB.06345-11>
- Scheu, Patrick D., Kim, O. Bin, Griesinger, C., & Uden, G. (2010). Sensing by the membrane-bound sensor kinase DcuS: Exogenous versus endogenous sensing of C4-dicarboxylates in bacteria. *Future Microbiology*, *5*(9), 1383–1402. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.103>
- Scheu, Patrick D., Steinmetz, P. a., Dempwolff, F., Graumann, P. L., & Uden, G. (2014). Polar Localization of a Tripartite Complex of the Two-Component System DcuS/DcuR and the Transporter DctA in *Escherichia coli* Depends on the Sensor Kinase DcuS. *PLoS ONE*, *9*(12), e115534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115534>
- Servin-Gonzalez, L., Sampieri, A. I. I. I., Cabello, J., Galvan, L., Juarez, V., & Castro, C. (1995). Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology*, *141*(10), 2499–2510. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-10-2499>
- Severi, E., Randle, G., Kivlin, P., Whitfield, K., Young, R., Moxon, R., Kelly, D., Hood, D., & Thomas, G. H. (2005). Sialic acid transport in *Haemophilus influenzae* is essential for lipopolysaccharide sialylation and serum resistance and is dependent on a novel tripartite ATP-independent periplasmic transporter. *Molecular Microbiology*, *58*(4), 1173–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04901.x>
- Shaw, J G, Hamblin, M. J., & Kelly, D. J. (1991). Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C4-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology*, *5*(12), 3055–3062.
- Shaw, Jonathan G., & Kelly, D. J. (1991). Binding protein dependent transport of C4-dicarboxylates in *Rhodobacter capsulatus*. *Archives of Microbiology*, *155*(5), 466–472. <https://doi.org/10.1007/BF00244963>
- Sillitoe, I., Bordin, N., Dawson, N., Waman, V. P., Ashford, P., Scholes, H. M., Pang, C. S. M., Woodridge, L., Rauer, C., Sen, N., Abbasian, M., Le Cornu, S., Lam, S. D., Berka, K., Varekova, I. H., Svobodova, R., Lees, J., & Orengo, C. A. (2021). CATH: Increased structural coverage of functional space. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D266–D273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1079>
- Singh, V. S., Tripathi, P., Pandey, P., Singh, D. N., Dubey, B. K., Singh, C., Singh, S. P., Pandey, R., & Tripathi, A. K. (2019). Dicarboxylate transporters of *Azospirillum brasilense* Sp7 play an important role in the colonization of finger millet (*Eleusine coracana*) roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(7), 828–840. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-18-0344-R>
- Sistrom, W. R. (1960). A requirement for sodium in the growth of *Rhodopseudomonas spheroides*. *Journal of General Microbiology*, *22*, 778–785. <https://doi.org/10.1099/00221287-22-3-778>
- Six, S., Andrews, S. C., Uden, G., & Guest, J. R. (1994). *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *Journal of Bacteriology*, *176*(21), 6470–6478.
- Skerker, J. M., Perchuk, B. S., Siryaporn, A., Lubin, E. A., Ashenberg, O., Goulian, M., & Laub, M. T. (2008). Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems. *Cell*, *133*(6), 1043–1054. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.040>
- Socket, R., Foster, J., & Armitage, J. P. (1990). Molecular biology of the *Rhodobacter sphaeroides* flagellum. *FEMS Symp*, *53*, 473–479.
- Song, L., Sudhakar, P., Wang, W., Conrads, G., Brock, A., Sun, J., Wagner-Döbler, I., & Zeng, A. P. (2012). A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-128>
- Spero, M. A., Brickner, J. R., Mollet, J. T., Pisithkul, T., Amador-Noguez, D., & Donohue, T. J. (2016). Different functions of phylogenetically distinct bacterial complex I isozymes. *Journal of*

- Turatsinze, J.-V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., & van Helden, J. (2008). Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nature Protocols*, 3(10), 1578–1588. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.97>
- Uden, G., Wörner, S., & Monzel, C. (2016a). Cooperation of Secondary Transporters and Sensor Kinases in Transmembrane Signalling: The DctA/DcuS and DcuB/DcuS Sensor Complexes of *Escherichia coli*. *Advances in Microbial Physiology*, 68, 139–167. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2016.02.003>
- Uden, Gottfried, Strecker, A., Kleefeld, A., & Kim, O. Bin. (2016b). C4-Dicarboxylate Utilization in Aerobic and Anaerobic Growth. *EcoSal Plus*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0021-2015>
- Valentini, M., Storelli, N., & Lapouge, K. (2011a). Identification of C4-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 193(17), 4307–4316. <https://doi.org/10.1128/JB.05074-11>
- Valentini, M., Storelli, N., & Lapouge, K. (2011b). Identification of C4-Dicarboxylate Transport Systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 193(17), 4307–4316. <https://doi.org/10.1128/JB.05074-11>
- Van Niel, C. (1944). The culture, general physiology, morphology and classification of the nonsulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 8, 1–118.
- Västermark, Å., & Saier, M. H. (2014). The involvement of transport proteins in transcriptional and metabolic regulation. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.002>
- Vega-Baray, B., Domenzain, C., Rivera, A., Alfaro-López, R., Gómez-César, E., Poggio, S., Dreyfus, G., & Camarena, L. (2015). The Flagellar Set Fla2 in *Rhodobacter sphaeroides* Is Controlled by the CckA Pathway and Is Repressed by Organic Acids and the Expression of Fla1. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 833–847. <https://doi.org/10.1128/JB.02429-14>
- Vermeglio, A., Borghese, R., & Zannoni, D. (2004). Interactions Between Photosynthesis and Respiration In Facultative Anoxygenic Phototrophs. In D. Zannoni (Ed.), *Respiration in Archaea and Bacteria* (2nd ed., pp. 279–295). Springer.
- Walderhaug, M. O., Polarek, J. W., Voelkner, P., Daniel, J. M., Hesse, J. E., Altendorf, K., & Epstein, W. (1992). KdpD and KdpE, proteins that control expression of the kdpABC operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *Journal of Bacteriology*, 174(7), 2152–2159. <https://doi.org/10.1128/jb.174.7.2152-2159.1992>
- Walmsleys, A. R., Shaw, J. G., & Kelly, D. J. (1992). The Mechanism of Ligand Binding to the Periplasmic C4-dicarboxylate Binding Protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(April 25), 8064–8072. <https://doi.org/10.1016/j.jinoche.2013.04.017>
- White, D., Drummond, J., & Fuqua, C. (Eds.). (2012a). Electron Transport. In *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* (4th ed., pp. 146–174). Oxford University.
- White, D., Drummond, J., & Fuqua, C. (Eds.). (2012b). Photosynthesis. In *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* (4th ed., pp. 175–198). Oxford University.
- Widenhorn, K. A., Somers, J. M., & Kay, W. W. (1989). Genetic regulation of the tricarboxylate transport operon (tctI) of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 171(8), 4436–4441. <https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4436-4441.1989>
- Willett, J. W., Tiwari, N., Müller, S., Hummels, K. R., Houtman, J. C. D., Fuentes, E. J., & Kirby, J. R. (2013). Specificity residues determine binding affinity for two-component signal transduction systems. *MBio*, 4(6), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00420-13>
- Winnen, B., Hvorup, R. N., & Saier, M. H. (2003). The tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family. *Research in Microbiology*, 154(7), 457–465. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00126-8)
- Witan, J., Monzel, C., Scheu, P. D., & Uden, G. (2012). The sensor kinase DcuS of *Escherichia coli*: Two stimulus input sites and a merged signal pathway in the DctA/DcuS sensor unit. *Biological*

-
- Chemistry*, 393(11), 1291–1297. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0229>
- Wyborn, N. R., Alderson, J., Andrews, S. C., & Kelly, D. J. (2001). Topological analysis of DctQ, the small integral membrane protein of the C4-dicarboxylate TRAP transporter of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 194(1), 13–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00492-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00492-4)
- Yarosh, O. K., Charles, T. C., & Finan, T. M. (1989). Analysis of C4-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Molecular Microbiology*, 3(6), 813–823. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00230.x>
- Zhou, Y. F., Nan, B., Nan, J., Ma, Q., Panjkar, S., Liang, Y. H., Wang, Y., & Su, X. D. (2008). C4-Dicarboxylates Sensing Mechanism Revealed by the Crystal Structures of DctB Sensor Domain. *Journal of Molecular Biology*, 383(1), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.010>
- Zientz, E., Janausch, I. G., Six, S., & Uden, G. (1999). Functioning of DcuC as the C4-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3716–3720. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2929.2004.01932.x>
- Zschiedrich, C. P., Keidel, V., & Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>

Artículo publicado

The periplasmic component of the DctPQM TRAP-transporter is part of the DctS/DctR sensory pathway in *Rhodobacter sphaeroides*

Veronica Jazmín Sánchez-Ortiz^{1,2}, Clelia Domenzain¹, Sebastian Poggio¹, Georges Dreyfus^{3,*} and Laura Camarena^{1,*}

Abstract

Rhodobacter sphaeroides can use C4-dicarboxylic acids to grow heterotrophically or photoheterotrophically, and it was previously demonstrated in *Rhodobacter capsulatus* that the DctPQM transporter system is essential to support growth using these organic acids under heterotrophic but not under photoheterotrophic conditions. In this work we show that in *R. sphaeroides* this transporter system is essential for photoheterotrophic and heterotrophic growth, when C4-dicarboxylic acids are used as a carbon source. We also found that over-expression of *dctPQM* is detrimental for photoheterotrophic growth in the presence of succinic acid in the culture medium. In agreement with this, we observed a reduction of the *dctPQM* promoter activity in cells growing under these conditions, indicating that the amount of DctPQM needs to be reduced under photoheterotrophic growth. It has been reported that the two-component system DctS and DctR activates the expression of *dctPQM*. Our results demonstrate that in the absence of DctR, *dctPQM* is still expressed albeit at a low level. In this work, we have found that the periplasmic component of the transporter system, DctP, has a role in both transport and in signalling the DctS/DctR two-component system.

INTRODUCTION

C4-dicarboxylic acids are relevant for bacteria since they can be used as a carbon source to be oxidized in the citric acid cycle, and anaerobically, several of these compounds are used for fumarate respiration. In photosynthetic bacteria, they act as carbon and electron donors [1, 2]. So far, many different protein families have been identified to be involved in the transport of these compounds [3, 4]. In *Escherichia coli* the main C4-dicarboxylic acid importer is DctA that is required during aerobic growth [5]; however, a $\Delta dctA$ strain is still able to grow at pH 5 given that the transporter protein DauA is active in this condition [6, 7]. During anaerobic growth DcuB is the most important C4-dicarboxylate/succinate antiporter for fumarate respiration [8, 9]. In contrast to *E. coli*, in many other bacteria, C4-dicarboxylic uptake is carried out by a multisubunit complex of proteins belonging to the tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) family of carriers. These transport systems have two membrane proteins and include a periplasmic component resembling the typical architecture of ABC transporters;

however, instead of using ATP, TRAP transporters use ion-electrochemical gradients for substrate uptake [10, 11]. A well-characterized member of this family is the DctPQM system of *R. capsulatus* (Fig. 1) [12].

The *dctA*, *dcuB* and *dctPQM* genes are regulated by a specific two-component signal transduction system that senses the presence of the substrate and controls the expression of the transporter system [4, 13, 14]. In *E. coli*, the histidine kinase DcuS and the response regulator DcuR are responsible for regulating the expression of *dctA* and *dcuB* in response to the presence of C4-dicarboxylic acids [3, 15, 16]. It has been demonstrated that in the absence of the transporter protein, the kinase is constitutively active, and its interaction with the transporter switches the kinase to a substrate-responsive state [5, 17–19]. In *Pseudomonas aeruginosa*, the two-component system formed by the kinase DctB and the response regulator DctD activate the expression of the sigma-54 dependent promoters of *dctA* and *dctPQM* [20].

Received 02 October 2020; Accepted 04 February 2021; Published 23 February 2021

Author affiliations: ¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico; ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico; ³Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico.

*Correspondence: Georges Dreyfus, gdreyfus@ifc.unam.mx; Laura Camarena, rosala@servidor.unam.mx

Keywords: DctR; DctS; DctPQM; *Rhodobacter sphaeroides*; TRAP-transporter.

Abbreviations: Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; DMSO, dimethyl sulfoxide; Gm, gentamicin; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; Kan, kanamycin; Nal, nalidixic acid; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline.

One supplementary table and four supplementary figures are available with the online version of this article.

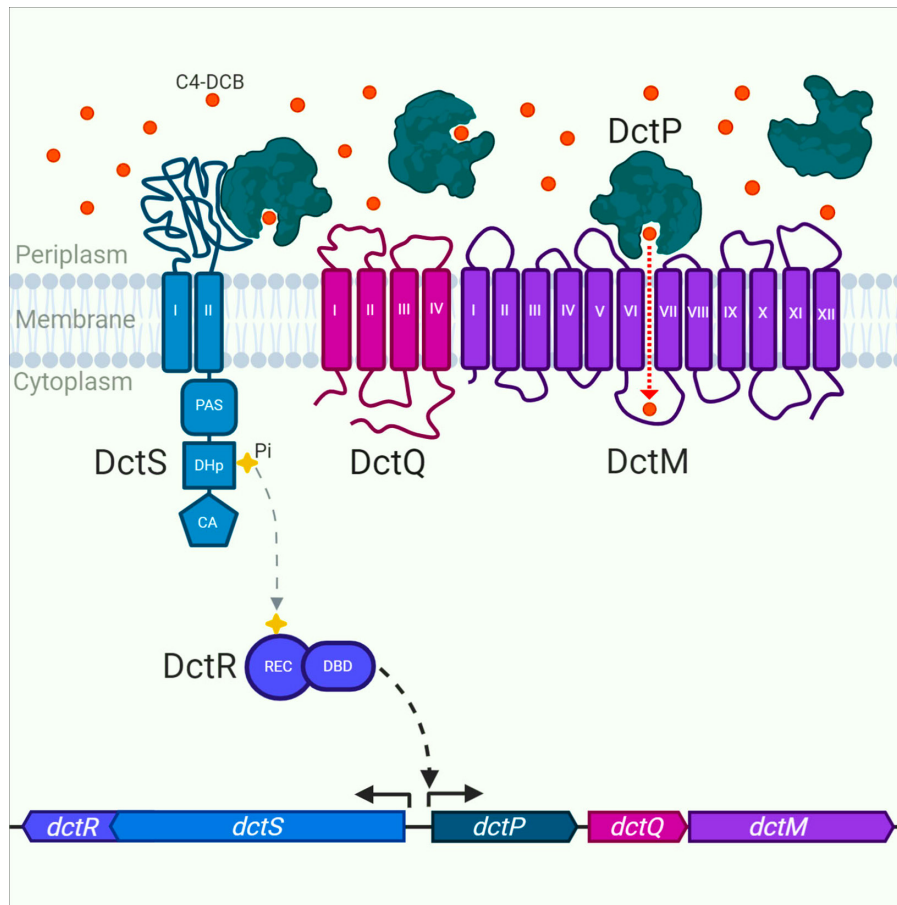


Fig. 1. Schematic representation of the DctPQM C-4 dicarboxylic acids (C4-DCB) transporter system and the proposed regulation of the DctS/DctR two-component system by DctP (this work). The transporter consists of the membrane proteins DctQ and DctM and the periplasmic binding protein DctP that binds C4-DCB. The genes encoding this transporter system are regulated by the two-component system formed by the membrane histidine kinase DctS, and the response regulator DctR. In the presence of C4-DCB, DctS phosphorylates DctR and the expression of the *dctPQM* operon is stimulated [12, 29]. Activation of DctS is dependent on the presence of DctP and is proposed to occur through the direct interaction between the periplasmic domain of DctS and DctP bound to a C-4 DCB (this work). In this figure the functional domains of DctS are indicated: PAS (Per-Arnt-Sim) as a round square, DHp (dimerization histidine phosphotransfer) as a square, and CA (catalytic) as a pentagon. The functional domains of DctR: REC (response regulator) as a circle, and DBD (DNA binding) as an oval. Figure created with BioRender.com.

R. sphaeroides is a metabolically versatile bacterium able to grow using anoxygenic photosynthesis, or by aerobic or anaerobic respiration. As with other anoxygenic phototrophic bacteria, *R. sphaeroides* was isolated using photoheterotrophic growth conditions that include an electron donor that other bacteria cannot use under these circumstances, such as malate and succinate [2, 21, 22]. Given that these organic acids are efficiently assimilated by *R. sphaeroides*, defined culture media have been customarily formulated using any of these organic compounds as carbon source [23, 24]. Recently, phenotype microarray assays have shown the ability of this bacterium to use more than 60 different carbon sources and as expected, the C4-dicarboxylates, malate and succinate are particularly good carbon sources [25]. In *R. capsulatus*, which is closely related to *R. sphaeroides*, transport of C4-dicarboxylic acids is mainly mediated by the DctPQM transporter. DctP is a periplasmic protein, whereas DctQ and DctM are membrane

proteins with four and twelve transmembrane segments, respectively (Fig. 1). In *R. capsulatus*, these proteins transport succinate and malate with high affinity and in their absence the mutant strain was unable to grow heterotrophically and its doubling time under photoheterotrophic conditions increased approximately four times when succinic or malic acids were used as the carbon source. This slow growth was ascribed to the presence of an additional low-affinity uptake system that it was presumably only expressed in this growth condition [12, 26–28].

In this bacterium, the DctPQM proteins are encoded by a tricistronic operon in which a putative rho-independent transcriptional terminator was detected at the intercistronic region between *dctP* and *dctQ*. The presence of this structure favours DctP accumulation over the other components of the transport system [27]. It has been shown that the expression of *dctPQM*

is positively controlled by the two-component system formed by the histidine kinase DctS and the response regulator DctR. These genes form a bicistronic operon that is transcribed divergently from *dctPQM* (Fig. 1) [29].

In *R. capsulatus* when succinic acid was used as the carbon source under photoheterotrophic conditions, the absence of DctS increased the generation time by approximately four-fold as compared to the wild-type strain. However, under heterotrophic conditions, the *dctS* and *dctR* mutants were unable to grow [29]. These results are similar to the growth pattern observed for *dctPQM* mutants [12]. The histidine kinase DctS has a large periplasmic region and it has been considered that this region could bind C4-dicarboxylic acids and generate a conformational change that promotes DctR phosphorylation and hence activation of the *dctPQM* [29].

R. sphaeroides, like *R. capsulatus*, has a *dctPQM* operon divergently transcribed from *dctSR*. In this work we show that in contrast to the situation observed in *R. capsulatus*, in *R. sphaeroides* a mutant strain lacking *dctPQM* is unable to grow with C4-dicarboxylic acids either heterotrophically or photoheterotrophically; but a *dctR* mutant is able to grow in these conditions albeit at a reduced growth rate. Importantly, we found that DctP plays a sensory role that is necessary to activate the two-component system DctS/DctR, which in turn upregulates *dctPQM* expression.

METHODS

Strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. *R. sphaeroides* AM1 [30] and its derivatives were grown chemoheterotrophically at 30 °C in Sistrom's minimal medium [24] containing 34 mM succinic acid, or in Sistrom's minimal medium in which succinic acid was reduced to 0.1 mM or substituted with 20 mM pyruvic acid. Inclusion of 0.2% (w/v) casamino acids in the culture medium is indicated. Photoheterotrophic liquid cultures were grown under continuous illumination in completely filled screw-cap tubes. Heterotrophic liquid cultures were incubated in the dark with orbital shaking at 200 r.p.m. *E. coli* was grown in Luria-Bertani (LB) medium [31] at 37 °C. When required, antibiotics were added at the indicated concentrations: for *R. sphaeroides*, kanamycin (25 µg ml⁻¹), tetracycline (1 µg ml⁻¹), spectinomycin (50 µg ml⁻¹) and hygromycin (20 µg ml⁻¹ for liquid cultures and 150 µg ml⁻¹ for plates); for *E. coli*, kanamycin (50 µg ml⁻¹), spectinomycin (50 µg ml⁻¹), ampicillin (100 µg ml⁻¹), hygromycin (20 µg ml⁻¹ for liquid cultures and 200 µg ml⁻¹ for plates) and nalidixic acid (20 µg ml⁻¹). When indicated, DMSO was included in the culture medium at a final concentration of 16 mM; and IPTG (1 mM) was used to induce expression from the *lacI*-controlled promoter pA1/04/03 [32] present in plasmid pIND4 [33] and in its derivative pINDGm.

Bacterial growth assays

All the strains were initially grown in Sistrom's minimal medium to late exponential phase. A sample from this culture was centrifuged at 5000 r.p.m. for 5 min, and the cellular pellet resuspended in the same volume of Sistrom's minimal medium without succinic acid or any other carbon source. The cells were washed two additional times before resuspension in the culture medium indicated for each experiment. The initial OD₆₀₀ was adjusted to 0.15. The cultures were incubated at 30 °C in flasks containing no more than 10% of the maximum volume, and the optical density (OD₆₀₀) was registered every 3 h. Growth under photoheterotrophic conditions was followed using cultures growing in cap-closed filled tubes. For each point to be measured along the time-curve a single tube was used and discarded after opening. These tubes were inoculated with a single batch of cells previously washed and adjusted at an OD₆₀₀ of 0.15. The cultures were incubated under constant lateral illumination. At least three independent experiments were carried out.

Oligonucleotides

The oligonucleotides used in this work were purchased from oligo T4 (Irapuato, Gto. Mex.) and are listed in Table S1 (available in the online version of this article).

Molecular biology techniques

Routine genetic manipulations were performed as described elsewhere [31]. Restriction and modification enzymes were purchased from Thermo Fisher Scientific. PrimeSTAR HS from Takara Bio Inc. was used for DNA amplification. Site-directed mutagenesis to obtain pBADHis_dctR_{D53E} was carried out using the Quick-Change system (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

Mutant isolation

All the mutants used in this work were obtained by gene replacement using a suicide plasmid carrying the mutant allele. To isolate the VS1 strain (Δ *dctPQM::hyg*), the mutant allele was obtained by cloning together two PCR products of the upstream and downstream regions from the *dctPQM* operon. The 740 bp product corresponding to the upstream region was obtained with the oligonucleotides DctPQMA1 and DctPQMA2, and the oligonucleotide pair DctPQMB1 and DctPQMB2 were used to obtain a 676 bp product from the downstream region. These PCR products were joined through an EcoRI site and cloned in pCR2.1TOPO. The 1.4 kb product was subcloned into pTZ18REcoRI-, and a hygromycin resistance cassette (*hyg*) obtained by PCR from pB45 plasmid [34], was cloned in pTZdctPQMAB previously linearized with EcoRI. The fragment carrying Δ *dctPQM::hyg* was subcloned in the suicide plasmid pJQ200mp18 [35]. The VS2 strain (*dctR::hyg*) was isolated by cloning two PCR products together corresponding to the upstream (oligonucleotides DctRupFW and DctRupRv) and downstream (oligonucleotides DctRdownFw and DctRdownRv) regions of *dctR*. These products of 704 and

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

<i>Rhodobacter sphaeroides</i> strains		
AM1	<i>R. sphaeroides</i> strain $\Delta fleQ::Kan$ <i>cckA</i> _{L391F} Nal ^R	[30]
VS1	AM1 derivative, $\Delta dctPQM::hyg$	This work
VS2	AM1 derivative, $\Delta dctR::hyg$	This work
<i>Escherichia coli</i> strains		
TOP10	Cloning strain	Invitrogen
LMG194	Protein expression strain	Invitrogen
Plasmids		
BBgus_rpDctPQM	pBBMCS53 carrying the promoter region from <i>dctPQM</i>	This work
BBgus_rpDctSR	pBBMCS53 carrying the promoter region from <i>dctSR</i>	This work
pB45	Plasmid source of the hygromycin cassette	[34]
pBAD-HisB	Expression vector of His6X-tagged proteins; Ap ^R	Invitrogen
pBADHis_dctP	Vector expressing His6X-DctP	This work
pBADHis_dctR	Vector expressing His6X-DctR	This work
pBADHis_dctR _{D53E}	Vector expressing His6X-DctR _{D53E}	This work
pBBMCS53	Transcriptional ' <i>uidA</i> fusion vector	
pCR2.1TOPO	Cloning vector Ap ^R Kan ^R	Invitrogen
pIND4	IPTG-inducible expression vector for <i>R. sphaeroides</i>	[33]
pINDGm	pIND4 carrying the Gm ^R resistance marker	Laboratory collection
pINDGm_dctP	Vector expressing <i>dctP</i>	This work
pINDGm_dctPQM	Vector expressing <i>dctPQM</i>	This work
pJQ_dctPQMUp-hyg-down	pJQ200mp18 carrying the allele $\Delta dctPQM::hyg$	This work
pJQ_dctRUp-hyg-down	pJQ200mp18 carrying the allele $\Delta dctR::hyg$	This work
pJQ200mp18	Mobilizable suicide vector for <i>R. sphaeroides</i> ; Gm ^R	[35]
pPIRL	Vector that encodes tRNAs for rare codons; Cm ^R	[41]
pRK_dctPQM	pRK415 carrying the complete operon <i>dctPQM</i>	This work
pRK_dctR	pRK415 carrying <i>dctR</i>	This work
pRK_rpDctPQM	pRK415_uidA-aadA carrying the promoter region of <i>dctPQM</i>	This work
pRK2013	Helper plasmid, ColE1, Mob ⁺ Tra ⁺ , Kan ^R	[69]
pRK415	pRK404 derivative used for expression in <i>R. sphaeroides</i>	[38]
pRK415_uidA-aadA	pRK415 carrying <i>uidA-aadA</i> in the opposite orientation of <i>plac</i>	Laboratory collection
pTOPO_dctPQMUp-down	Plasmid carrying the upstream and downstream regions of <i>dctPQM</i>	This work
pTZ_dctPQM	pTZ19R carrying the complete operon <i>dctPQM</i>	This work
pTZ18R/19R	Cloning vectors	Pharmacia
pTZ18REco-	pTZ18R without EcoRI site	Laboratory collection
pTZEco-_dctPQMUp-down	pTZ18REco- carrying the upstream and downstream regions of <i>dctPQM</i>	This work
pTZEco-_dctPQMUp-hyg-down	pTZ18REco- carrying the allele $\Delta dctPQM::hyg$	This work
pTZEco-_dctRUp-down	pTZ18REco- carrying the upstream and downstream regions of <i>dctR</i>	This work
pTZEco-_dctRUp-hyg-down	Plasmid carrying the allele $\Delta dctR::hyg$	This work

727 bp respectively, were ligated together using an EcoRI restriction site included in the oligonucleotide sequences. The product of 1.4 kb was cloned into pTZ18REco-, and it was linearized with EcoRI and ligated with a hygromycin resistance cassette (hyg) obtained by PCR from the pB45 plasmid. The fragment carrying $\Delta dctR::hyg$ was subcloned into the suicide plasmid pJQ200mp18. In all cases, the suicide plasmid was introduced to *R. sphaeroides* by conjugation, and the double recombination events were selected as described previously [36]. For all the mutants, the presence of the correct gene replacement was verified by PCR.

Conjugation

Plasmid DNA was mobilized into *R. sphaeroides* by conjugation according to published procedures [37]. Briefly, triparental matings were performed by mixing 1 ml of exponential growing cultures of the following strains: *E. coli* carrying the appropriated pJQ_200mp18 derivative plasmid, *E. coli* carrying pRK2013 helper plasmid and the recipient *R. sphaeroides* strain. The cells were collected, washed with LB and placed on the surface of a filter placed on LB plates. After 6 h of incubation at 30 °C, the filters were transferred to sterile Eppendorf tubes containing 0.5 ml of LB. After vigorous vortexing, from 10 to 100 μ l of the mating mixture was plated on LB containing the required antibiotics for selection, and nalidixic acid for counterselection of the donor strains.

Plasmid constructs used in this work

pRK415_dctPQM plasmid carries the complete *dctPQM* operon under the control of *lacP* present in pRK415 [38]. For this plasmid, the DNA fragment carrying *dctPQM* was obtained by PCR using the oligonucleotides DctPQMF and DctPQMR. The resulting product of 3161 bp was cloned into pTZ19R (Pharmacia) as a BamHI-EcoRI fragment, and subsequently subcloned into pRK415 [38]. Likewise, using the same forward oligonucleotide and pINDPQMR as reverse primer, the PCR product of 3161 bp flanked by BamHI and HindIII restriction sites was cloned into the pINDGm vector (a derivative of pIND4 [33]) to obtain pIND_dctPQM. The pRK_dctR plasmid was constructed by cloning the 1302 bp PCR product obtained using the oligonucleotides DctRupFW and DctRcompRV into pRK415. The pIND_dctP plasmid was obtained by cloning the 1071 PCR product generated with the oligonucleotides DctPQMF and pBADdctPRv into pINDGm. The promoter region of *dctSR* (*rpDctSR*), which encompasses from -174 to +36 considering the translation start point of *dctS* as +1, was amplified by PCR using the oligonucleotides RPdctSPF and RPdctSPR, the 210 bp product was cloned into pBBMCS53 [39]. The promoter region of *dctPQM* (*rpDctPQM*), which encompasses from -175 to +35 considering the translation start point of *dctP* as +1, was amplified by PCR using the oligonucleotides RPdctPQM1 and RPdctPQM2. The product of 210 pb was cloned into pBBMCS53. The promoter region of *dctPQM* was also cloned in pRK415_uidA-aadA, generating the transcriptional fusion of the *dctPQM* promoter with *uidA*; for this, BBgus_rpdctSP was digested with EcoRI

and SacI, the resultant DNA fragment of 210 bp was gel-purified and subcloned into pRK_uidA-aadA.

β -glucuronidase assays

β -glucuronidase was determined from sonicated cell-free extracts using 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide as the substrate following the previously published protocols [40]. Activities are reported as nanomoles of 4-methylumbelliferone formed per min per mg of protein at 37 °C. Total protein was measured by the Bradford assay (BioRad). For each sample, three to five independent experiments were carried out. The average values and standard deviation are shown. Cell-free extracts were obtained from cultures grown under the indicated conditions that included the required antibiotics for each strain. Cells were collected during the middle exponential growth phase when applicable, or at an OD₆₀₀ of 0.4 when strains with different doubling time rates were tested. The cellular pellet was suspended in sodium phosphate buffer 50 mM pH 7 containing 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM EDTA and 0.1% Triton X-100. The cell suspension was sonicated on ice with three bursts of 5 s. Cell debris were removed by centrifugation. The supernatant was assayed for activity using 1 mM of 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide in sodium phosphate buffer.

DctR overexpression and purification

dctR was amplified by PCR using the primers DctRA and DctRB. The DNA product of 678 bp was cloned into pBAD-HisB (Invitrogen). The resultant plasmid, pBADHis_dctR was co-transformed with pPIRL [41] into LMG194 strain. To express His_{6x}-DctR a culture of LMG194/pBADHis_dctR/pPIRL was grown in LB at 37 °C; when the culture reached an OD₆₀₀ of 0.5, arabinose was added to a final concentration of 0.2% (w/v), and cultivation was continued by 4 h. Cells were harvested and resuspended in a buffer containing 20 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 15% (v/v) glycerol and 1 mg ml⁻¹ lysozyme. Cell lysis, protein binding to Ni-NTA agarose, washing and elution were carried out following the protocol reported elsewhere (Qiagen). The same procedure was used for DctR_{D53E}.

DctP overexpression and purification

To overexpress the mature form of DctP, the coding region of *dctP* was amplified using the oligonucleotides pBAD-dctPFw and pBADdctPRv. This 936 bp product excludes the first 78 bp of *dctP* that encode the signal peptide of the protein. After gel-purification, this product was cloned into pBAD-HisB. His_{6x}-DctP was purified from a culture of the TOP10/pBADHis_dctP strain that was induced for 4 h with 0.2% (w/v) arabinose added during the exponential phase. Cells were harvested and resuspended in a buffer containing 20 mM Tris (pH 8), 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 15% (v/v) glycerol and 1 mg ml⁻¹ lysozyme. Cell lysis, protein binding to Ni-NTA agarose, washing and elution were carried out following a protocol reported elsewhere (Qiagen).

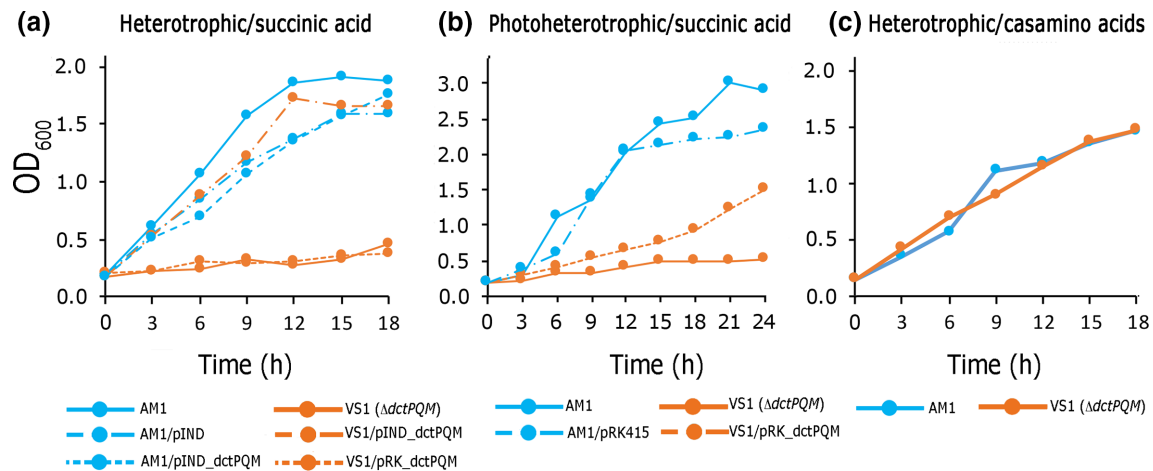


Fig. 2. Growth phenotype and complementation of a *dctPQM* mutant strain. Growth curves of strains AM1 and VS1 ($\Delta dctPQM::hyg$) in Sistrom's medium containing 34 mM succinic acid as a carbon source (a, b). (a) Growth under heterotrophic growth conditions. (b) Growth under photoheterotrophic conditions. (c) Growth under heterotrophic conditions with 0.2% casamino acids as carbon source. These are representative results from three independent experiments.

Antibodies and Western blotting

Polyclonal antibodies were raised in female BALB/c mice against His_{6X}-DctP, or His_{6X}-DctR as described previously [42]. For immunoblotting, proteins were separated by SDS-12% PAGE [43], blotted onto nitrocellulose, and tested with the primary antibody after blocking in 2% (w/v) nonfat milk-PBS [44]. Anti-His_{6X}-DctP and anti-His_{6X}-DctR were used at a 1/10000 and 1/3000 dilution, respectively, as primary antibodies. Anti-mouse IgG AP conjugate (Sigma-Aldrich) at a 1/30000 dilution was used as the secondary antibody. Detection was carried out with CDP-Star substrate (Applied Bio-systems) and visualized by autoradiography.

Tertiary structure prediction

The I-Tasser Web server (Iterative Threading Assembly Refinement – <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [45] was used to generate potential structural models of the periplasmic domain of DctS. From this model the potential ligand and its binding site were predicted using the COACH server [46].

Gel mobility shift assays

Binding reactions were carried out in 1X EMSA binding buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 5 mM MgCl₂, 1 μM β-mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA] in a total volume of 10 μl. Each reaction included 5 nM of DNA from the *dctPQM* regulatory region (210 pb). The presence in the reaction of an unspecific DNA fragment of 100 bp is indicated. DctR_{D53E} was included in the range of concentrations from 0.5 to 3 μg. After 30 min of incubation at 30 °C, the samples were loaded on a 10% native polyacrylamide gel and run at 10 mA in a buffer containing 7.2 mM Tris-HCl pH 7.9, 3.3 mM acetic acid

and 1 mM EDTA. After electrophoresis, DNA was detected by ethidium bromide staining.

RESULTS

DctPQM is essential for heterotrophic and photoheterotrophic growth

To determine if DctPQM is the sole transporter system for C4-dicarboxylic acids that supports growth of *R. sphaeroides* when these compounds are used as carbon and electron donors, we isolated a mutant strain in which the three genes of the operon were deleted and replaced by a hygromycin resistance cassette (VS1 strain). The growth of this strain was tested under heterotrophic and photoheterotrophic conditions using succinic acid as a carbon source. In contrast to the parental strain AM1, VS1 did not grow in either of these conditions (Fig. 2a, b). The same result was observed when malic acid was used as a carbon source (data not shown). Nonetheless, AM1 and VS1 showed the same growth ability when casamino acids were used as a carbon source (Fig. 2c). These results suggest that in *R. sphaeroides*, DctPQM is the only C4-dicarboxylic transporter under the growth conditions tested.

Two different plasmids were constructed that express *dctPQM*, one of them is a derivative from the low copy number vector pRK415, which enables the expression of the cloned genes from the *lac* promoter [38], and the other is a derivative of pIND_Gm that has an intermediate copy number and carries the *lacI*-regulated pA1/04/03 promoter, which is inducible by IPTG [33, 47]. The expression of the cloned genes in these plasmids was verified by Western blot using sera against the DctP protein (Fig. S1). From this assay, we also observed that the amount of protein detected in this experiment was consistent with the promoter strength and the copy number of pRK415 and pINDGm plasmids. Under heterotrophic

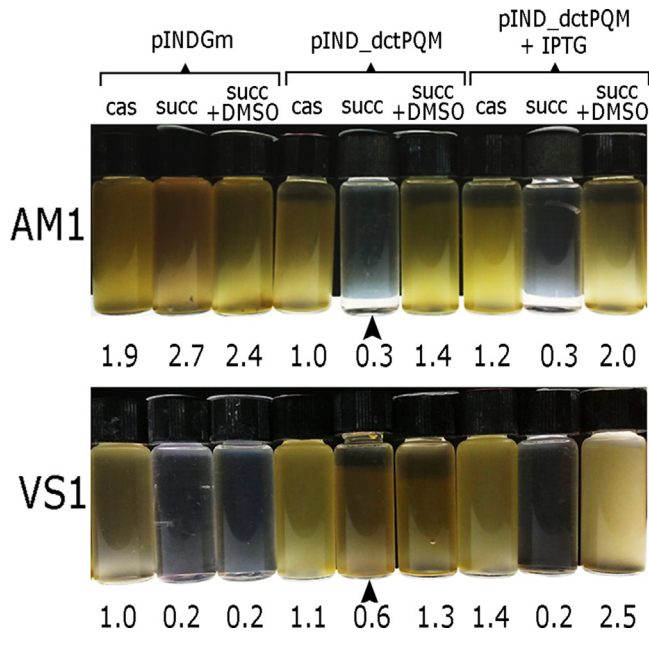


Fig. 3. Photoheterotrophic growth of AM1 and VS1 (Δ *dctPQM::hyg*) strains using 0.2% casamino acids (cas) or 34 mM succinic acid (succ) as a carbon source. In the upper panel of the figure the plasmid that is present in each strain and the condition tested is indicated. Vials were incubated for 48 h as described in Methods. The numbers below are the final OD₆₀₀. The vials were illuminated from below against a black background, for the picture only.

conditions using succinic acid as the only carbon source, the growth ability of strain VS1 was only restored when *dctPQM* was expressed from pIND_{Gm}, indicating that a high level of expression of this operon is required to achieve an efficient transport of C4-dicarboxylic acids. The presence of pIND_{dctPQM} did not improve growth of the parent strain AM1 under the same heterotrophic growth conditions (Fig. 2a) suggesting that uptake of these compounds is not the limiting factor for cell growth.

Fig. 3 shows that under photoheterotrophic growth conditions using succinic acid as a carbon source, strain VS1 was successfully complemented by pIND_{dctPQM} but unexpectedly, AM1/pIND_{dctPQM} did not grow (Fig. 3, compare tubes labelled with an arrowhead). Considering that AM1/pIND was able to grow in this condition, and that VS1/pIND_{dctPQM} showed a better growth in the absence of IPTG than in its presence (Fig. 3), we believe that a high level of DctPQM may result in a major accumulation of succinic acid, which could overreduce the quinone pool since succinic acid is used as an electron donor in photoheterotrophic growth. Therefore, DMSO was added to the culture medium, as an alternative electron acceptor to balance the quinone/quinol pool [48–52]. As shown in Fig. 3, the presence of DMSO restored growth of AM1/pIND_{dctPQM} suggesting that under photoheterotrophic conditions an excess of the DctPQM transporter is detrimental to maintain the redox balance. The presence of DMSO also allowed growth of VS1/

pIND_{dctPQM} with IPTG. As expected, DMSO (i.e. without adding a carbon source) did not support growth of VS1 or any other strain for that matter (data not shown).

As shown in Fig. 2a, pRK_{dctPQM} was unable to support growth of strain VS1 strain under heterotrophic conditions using succinic acid as a carbon source, probably due to a low expression of *dctPQM*. Therefore, we tested if under photoheterotrophic conditions this plasmid could promote growth of VS1 using succinic acid as carbon source. An improvement in the growth of VS1 by the presence of pRK_{dctPQM} was observed; however, it remained lower than that of AM1/pRK (Fig. 2b).

It should be noted that even though the DctPQM transporter is essential for growth in the presence of C4-dicarboxylic acids under heterotrophic and photoheterotrophic conditions, we noticed that a heterotrophic culture of VS1 cells in succinic or malic acid, showed a fast and sustained increase of its OD₆₀₀ after 30 h of incubation, indicating a dramatic change in the VS1 phenotype. Subcultures from these cells showed a growth curve similar to that observed for AM1. This acquired growth proficiency of VS1 cells was independent of the C4-dicarboxylic acid used in the original culture. This result indicates that in the absence of DctPQM it is possible to obtain secondary suppressor mutants that restore growth using these compounds (Fig. S2).

Optimal expression of *dctPQM* requires the DctS/DctR two-component system

A strain lacking *dctR* was isolated and the absence of DctR was verified by Western blot (Fig. 4b). This strain (VS2 Δ *dctR::hyg*) grew slower than AM1 under heterotrophic and photoheterotrophic conditions when succinic acid was used as a carbon source (Fig. 4a). This result suggests that DctR is required for the optimal expression of *dctPQM* but is not essential, in contrast to the situation observed in *R. capsulatus*, where DctR is essential for heterotrophic growth using succinic acid as a carbon source [29]. The expression of *dctPQM* in the VS2 strain was tested by evaluating the presence of DctP in total cell extracts of VS2. As shown in Fig. 4c, a low amount of DctP was detected in cell extracts from VS2 as compared with AM1. This is in agreement with the idea that DctR activates the expression of *dctPQM* but is not essential. The ability of VS2 to grow efficiently on succinic acid as a carbon source was restored by introduction of plasmid pRK_{dctR} (Fig. 4a), indicating that no other mutation in VS2 was responsible for the observed phenotype. In agreement with the idea that the growth defect of VS2 is only caused by the low expression of *dctPQM* due to the absence of the activator protein DctR, we observed that the expression of *dctPQM* from pIND_{dctPQM} in VS2 was enough to support growth under these conditions, indicating that the growth defect caused by the absence of DctR is directly related to the expression level of *dctPQM* (Fig. 4a). As a control, the presence of DctR in the complemented cells (VS2/pRK_{dctR}) was confirmed by Western blot (Fig. 4b). Likewise, the presence of DctP but not of DctR in VS2/pIND_{PQM} was also verified (Fig. 4b, c, respectively).

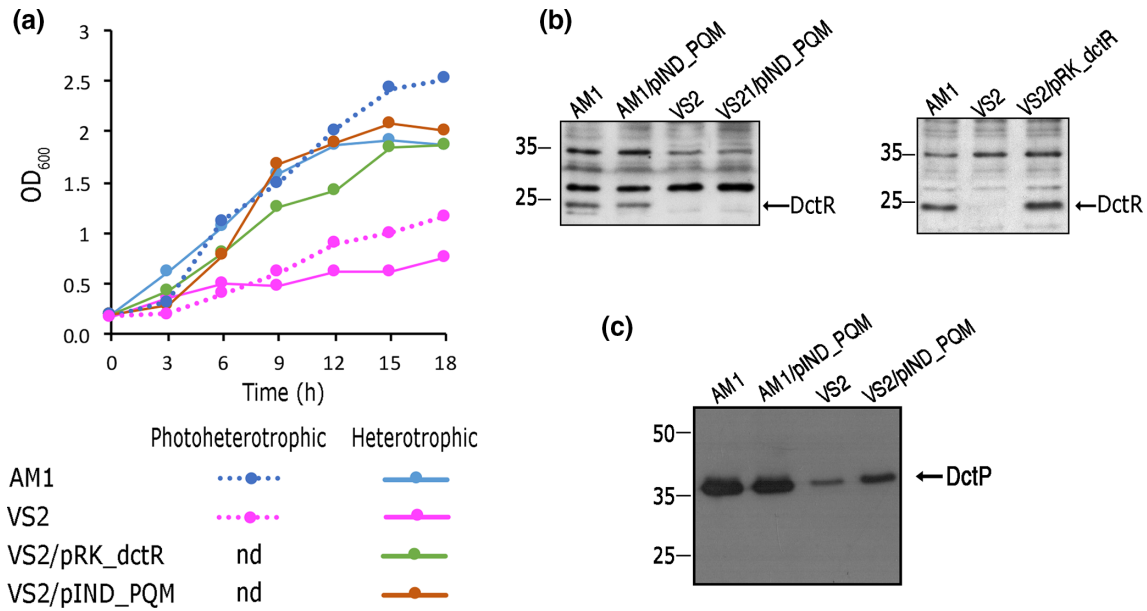


Fig. 4. Growth phenotype and complementation of a *dctR* mutant strain. (a) Growth curves of strains AM1 and VS2 ($\Delta dctR::hyg$) in Sistrom's medium containing 34 mM succinic acid as a carbon source under heterotrophic and photoheterotrophic conditions. Representative results from three independent experiments are shown. (b) Western blot of DctR using total cell extracts of the indicated strains grown heterotrophically. DctR antiserum detects several nonspecific bands on the blot, positive identification of DctR was carried out by including a cell extract of VS2 ($\Delta dctR::hyg$) in the experiment. In this sample a single band of the expected size for DctR (21678 Da) was missing, as compared with the positive control. Therefore, this band was assigned as DctR. Migration of the molecular mass markers, carbonic anhydrase (approx. 35000 Da) and β -lactoglobulin (approx. 25000 Da) is shown at the left and expressed in kDa. (c) Western blot analysis of DctP (33588 Da) using total cell extracts of the indicated strains grown heterotrophically. Migration of the molecular mass markers, ovalbumin (approx. 50000 Da), carbonic anhydrase (approx. 35000 Da) and β -lactoglobulin (approx. 25000 Da) is shown at the left and expressed in kDa.

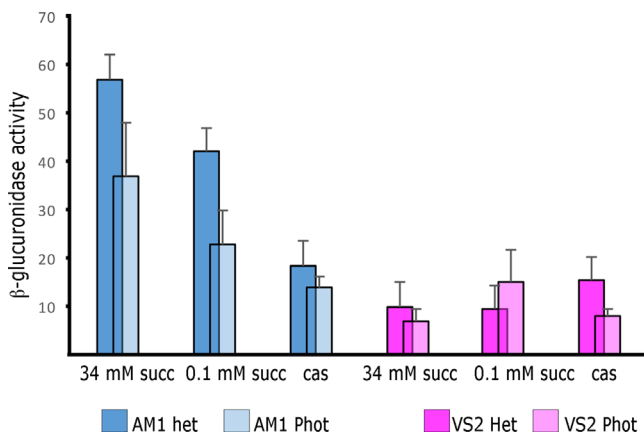


Fig. 5. Activity of the *dctPQM* promoter in the absence of DctR. β -glucuronidase activity induced by the *dctPQM* promoter. The strains AM1 and VS2 ($\Delta dctR::hyg$) carrying plasmid BBgus_rpdctPQM were grown either heterotrophically or photoheterotrophically using Sistrom's minimal medium with either 34 mM, 0.1 mM succinic acid or 0.2% casamino acids as carbon sources. At least three independent experiments were carried out. Standard deviation is indicated. Activity is reported as nanomoles of 4-methylumbelliferone $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$.

In order to correlate growth of VS2 and the expression level of *dctPQM*, we cloned the control region of this operon upstream of the reporter gene *uidA* encoding for the enzyme β -glucuronidase. The resulting plasmid pBBgus_rpdctPQM was introduced to strains AM1 and VS2, and the activity of the reporter gene was determined. The highest activity was detected when AM1 was grown under heterotrophic conditions using succinic acid 34 mM. β -glucuronidase activity was reduced by 30% when the concentration of succinic acid was reduced to 0.1 mM (Fig. 5). In the absence of DctR (strain VS2), the expression of the reporter gene was reduced approximately sixfold, but it was still detectable, supporting the notion that DctR is required to activate the *dctPQM* promoter (*dctPQMp*) but is not indispensable (Fig. 5). Noteworthy, under photoheterotrophic conditions using succinic acid as a carbon source, β -glucuronidase activity was reduced approximately by a 50% as compared to the heterotrophic growth conditions regardless the concentration of succinic acid tested (Fig. 5).

DctPQM is required for the complete induction of *dctPQMp*

We determined the transcriptional activity of the *dctPQM* promoter in strain VS1 ($\Delta dctPQM::hyg$) in order to test if

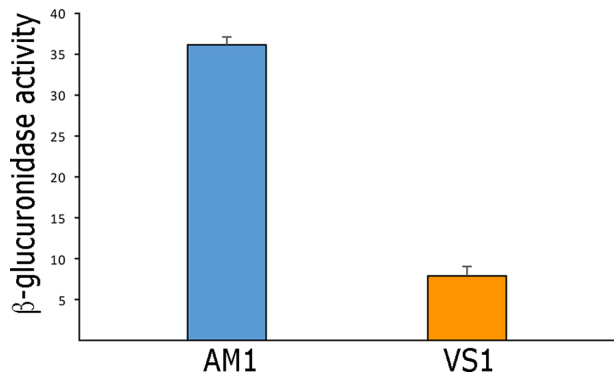


Fig. 6. β -glucuronidase activity induced by the *dctPQM* promoter in the absence of DctPQM. AM1 and VS1 (Δ *dctPQM*) strains carrying plasmid BBgus_rpdctPQM were grown heterotrophically using Sistro's minimal medium with 34 mM succinic acid and 0.2% casamino acids. At least three independent experiments were carried out. Standard deviation is indicated. Activity is reported as nanomoles of 4-methylumbelliferone formed min^{-1} mg of protein $^{-1}$.

the transporter system was required to activate the expression of its own promoter. Given that VS1 is unable to grow in a medium with succinic acid as the only carbon source (Fig. 2), we had to include another carbon source to support growth of this strain. Therefore, we evaluated the amount of β -glucuronidase produced by VS1/BBgus_rpdctPQM using a medium supplemented with 0.2% casamino acids and 34 mM succinic acid. As shown in Fig. 6, β -glucuronidase activities were lower in this medium that includes casamino acids than in the presence of succinic acid only (see Fig. 5 for comparison). Nevertheless, it was clearly observed that in the absence of DctPQM the activity of the *dctPQM* promoter is severely reduced (Fig. 6), suggesting that the transporter system or its activity are necessary for activation of the two-component system. It is not clear why the inclusion of casamino acids in the culture medium reduces the expression of the *dctPQM* promoter, since in *R. sphaeroides* aspartic acid has no effect on the uptake of succinate [53], and this amino acid only reduces a 10% the binding of DctP to L-malate [27]; suggesting that other physiological controls could be behind this effect.

The previous result poses two different possibilities to explain the mechanism of DctS activation, one is through the interaction between DctQM and DctS; alternatively, this interaction could occur between the periplasmic region of DctS and the periplasmic protein DctP.

Some histidine kinases use a periplasmic protein to sense the presence of an activator molecule [54–58]. To evaluate if DctP plays a role as a sensory component of the two-component system, we determined the transcriptional activity of the *dctPQM* promoter in VS1, VS2 and AM1 strains carrying the reporter plasmid pRK_rpdctPQM and pIND_dctP that expresses *dctP*. From these experiments, a strong increase in β -glucuronidase activity was detected when DctP was expressed in VS1 (Fig. 7a), suggesting that DctP is part of the sensory system that promotes the expression of *dctPQM*

operon in response to C4-dicarboxylic acids. We also observed an increase in β -glucuronidase activity in AM1 but to a minor extent, this modest increase could be explained by the presence of DctQM that should reduce the amount of activated DctP and theoretically could also compete with DctS for DctP, reducing the probability of DctP to activate the kinase activity of DctS. As expected, in the absence of DctR (strain VS2) the activity of the *dctPQM* promoter was extremely low (Fig. 7a). We also measured the β -glucuronidase activity of these strains using pyruvic acid as a carbon source as expected DctP marginally increased the activity of the reporter gene. The presence of DctP in selected strains used in this experiment was confirmed by Western blot (Fig. 7b).

From these results it is evident that DctP is an important component for the activation of the two-component system DctS/DctR, which in turn will activate the expression of the *dctPQM* promoter in response to the presence of succinic acid in the culture medium; this result is in agreement with the model of the structure of the periplasmic region of DctS that did not predict a binding site for C4-dicarboxylic acids, even though its tertiary structure is fairly similar to the periplasmic domain of the histidine kinases DctB from *Sinorhizobium meliloti* and *Vibrio cholerae* [59, 60] (Fig. S3a, b). Nevertheless, the possibility that DctS binds C-4 dicarboxylic acids cannot be ruled out and experimental approaches will be needed to determine this point.

The expression of *dctSR* is independent of the presence of DctR

To investigate if the expression of the genes encoding the DctS/DctR two-component system, is regulated by the presence of succinic acid in the culture medium, we cloned the promoter region of *dctSR* upstream of the *uidA* reporter gene. The resulting plasmid was introduced to AM1 and β -glucuronidase activity was determined in cells grown in either 34 or 0.1 mM succinic and supplemented with 0.2% casamino acids. The amount of β -glucuronidase was similar regardless of the concentration of succinic acid. However, when the cells were grown photoheterotrophically, β -glucuronidase activity was lower (Fig. 8 blue light bars). To determine if DctR was involved in controlling the expression of the *dctSR* promoter, the reporter plasmid was introduced into VS2 cells. The level of β -glucuronidase activity was similar to that found in AM1 cells grown heterotrophically. It should be noted that β -glucuronidase activity was not reduced when VS2 cells were grown photoheterotrophically (Fig. 8). These results suggest that DctR does not activate the expression of the *dctSR* operon. Nonetheless, it seems that DctR is required for the reduction in the activity of this promoter under photoheterotrophic conditions.

DctR binds to the regulatory region of *dctPQM*

To examine if DctR binds to the promoter region of *dctPQM*, the phosphomimetic version of DctR (DctR_{D53E}) was used in an electrophoretic mobility shift assay. We observed that DctR_{D53E} did not bind strongly to this region under the experimental conditions tested (Fig. S4a). Nonetheless DctR_{D53E} was

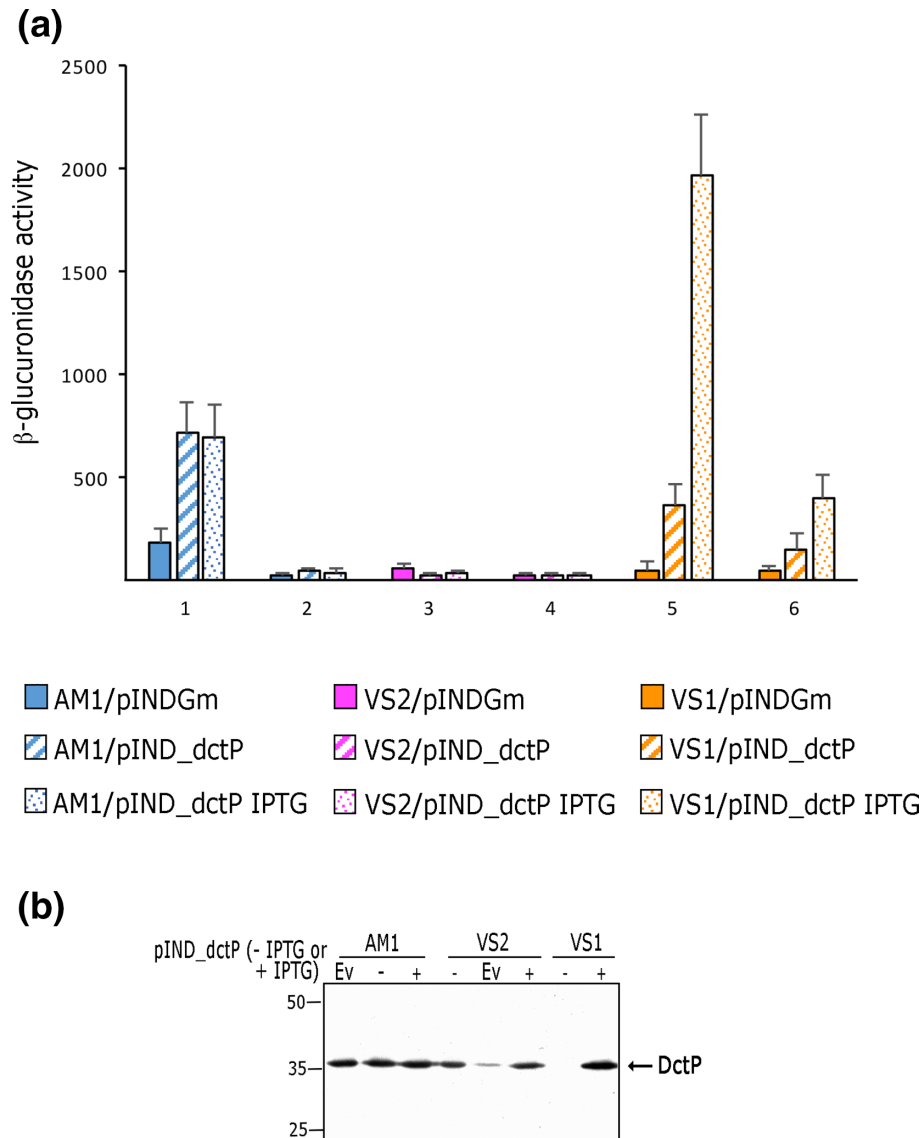


Fig. 7. Effect of DctP on the activation of the DctS/DctR system. (a) Activity of the *dctPQM* promoter measured as β -glucuronidase activity. The strains AM1, VS1 ($\Delta dctPQM::hyg$) and VS2 ($\Delta dctR::hyg$) carrying pRK_rpdctPQM as well as the compatible plasmid pINDGm or pIND_dctP were tested. The strains were grown heterotrophically using Sistrom's minimal medium with 34 mM succinic acid and 0.2% casamino acids (sets 1, 3 and 5) or in Sistrom's minimal medium containing 20 mM pyruvic acid and 0.2% casamino acids (sets 2, 4 and 6). At least three independent experiments were carried out. Standard deviations are indicated. Activity is reported as nanomoles of 4-methylumbelliferone formed $\text{min}^{-1} \text{mg}$ of protein $^{-1}$. (b) Western blot anti-DctP of total cell extracts from the strains used for the activity experiments are shown in (a). The presence of the empty plasmid pINDGm (Ev) or pIND_dctP is indicated, as well as the inclusion (+) or not (-) of IPTG in the culture. Migration of the molecular mass markers, ovalbumin (approx. 50000 Da), carbonic anhydrase (approx. 35000 Da) and β -lactoglobulin (approx. 25000 Da) is shown at the left and expressed in kDa.

able to form a complex with the regulatory region of *dctPQM* and it did not bind to an unrelated DNA fragment (Fig. S4b). This result supports the idea that DctR directly controls the expression of *dctPQM* promoter.

DISCUSSION

Previous to this work, *R. capsulatus* was the only photosynthetic organism where transport of C4-dicarboxylic acids

mediated by DctPQM had been characterized. It was recognized that these proteins were part of a new family of transporter systems, making DctPQM the foundational member of this family. It was reported that DctPQM is essential for heterotrophic growth but not under photoheterotrophic conditions. This was attributed to an unknown transporter that is present in photoheterotrophic growth conditions [12, 26]. In this work, we show that in *R. sphaeroides* DctPQM is

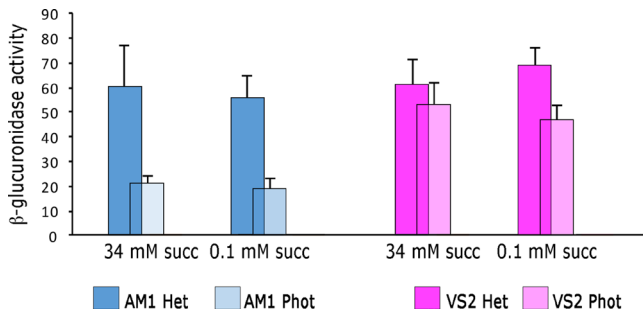


Fig. 8. β -glucuronidase activity induced by the *dctSR* promoter. AM1 and VS2 (Δ *dctR::hyg*) strains carrying the BB_{gus}_rpdctSR plasmid were grown heterotrophically or photoheterotrophically in either 34 or 0.1 mM succinic acid with 0.2% casamino acids. At least three independent experiments were carried out. Standard deviations are indicated. Activity is reported as nanomoles of 4-methylumbelliferone formed min^{-1} mg of protein $^{-1}$.

essential for heterotrophic and photoheterotrophic growth, indicating that no other transporter system can replace the function of DctPQM in this micro-organism. This implies that the hypothetical transporter proposed to be present in *R. capsulatus*, probably does not exist in *R. sphaeroides*, or it may not be expressed under the conditions tested in this study. In this regard, it should be noticed that we isolated spontaneous mutants from Δ *dctPQM* cells that recovered the ability to grow with C4-dicarboxylic acids; in these strains, the suppressor mutation could be altering the specificity of a transporter protein, and/or increasing its expression. The mutation responsible for this phenotype remains to be revealed but searching the *R. sphaeroides* genome for possible C4-dicarboxylic acid transporters we found a homologue of DauA, but we did not find homologues of DctA or DcuB/A, suggesting that an alteration in DauA could be responsible for the suppression of the Δ *dctPQM* mutation. Alternatively, mutations in other genes encoding TRAP transporters of the *dctPQM* family could also account for this phenotype.

The expression of the genes encoding C4-dicarboxylic acid transport systems is frequently controlled by a two-component system that in some cases is modulated by the transporter protein itself [4, 61]. Our results show that similar to the situation previously reported for *R. capsulatus*, the activation of *dctPQM* is dependent on the kinase DctS and the response regulator DctR [29]. However, in contrast to this micro-organism, in *R. sphaeroides*, the mutant strain Δ *dctR* is able to grow heterotrophically using C4 dicarboxylic acids albeit at a low rate. Accordingly, in the absence of DctR, it was possible to detect expression of the *dctPQM* promoter and also detect the presence of DctP in total cell extracts. In addition, we show that DctP is required for activation of DctS in a substrate-responsive manner. The activation of DctS by DctP occurs even in the absence of DctQM so, the periplasmic protein DctP is a direct sensor for the two-component system DctS/DctR.

In this scenario, we could expect that in *R. sphaeroides* the DctR-independent expression of *dctPQM* will allow the

presence of all the components of the system at a low level, guaranteeing that DctP will be available to increase the expression of the DctPQM transporter when the substrate becomes available.

In contrast with other sensory kinases such as DctB that is able to bind the substrates directly [59], DctS does not seem to have this ability since it does not contain the conserved residues that bind the carboxylate group in its periplasmic domain. However, this contention remains to be experimentally tested.

The modulation of histidine kinases that regulate the expression of transporter systems by their interaction with extracytoplasmic solute receptors, such as DctP, has been previously reported for other transporter families. For instance, for the citrate transporter BctCAB of *Bordetella pertussis*, which belongs to the tripartite tricarboxylate transporter family (TTT). In this case, the periplasmic component BctC in the presence of citrate, interacts with the kinase BctE to bring about phosphorylation of the response regulator BctD, which in turn activates the expression of *bctCAB* [57]. For *Bacillus subtilis* it has been reported that succinate and fumarate transport is dependent on the symporter protein DctA (YdbH). In this case, the periplasmic protein DctB (YdbE), which is similar to DctP but is encoded by an orphan monocistronic gene has no role in C4-dicarboxylic transport but instead it interacts with the histidine kinase DctS (YdbF) forming a tripartite complex along with DctA. This complex acts as the functional unit for C4-dicarboxylic sensing, phosphorylating DctR (YdbG) in response to the presence of substrate [62, 63].

In *R. sphaeroides*, DctP is required for transport and also for signalling similar to the citrate binding protein BctC from *B. pertussis* [57]. Although the physical interactions of DctP with DctS, and with the DctQM complex remain to be demonstrated. The independent interaction of DctP with DctS and DctQM would imply a competition for DctP. The affinity of DctP for these proteins in the absence and presence of C4-dicarboxylic acids will help clarify if the membrane components of the transporter system modulate DctS activation.

The role of DctP as a sensory component of the two-component signal transduction system together with the role established for BctC and the orphan DctB from *B. subtilis*, highlight the relevance of the periplasmic component of the different families of transporter systems (either TTT or TRAP families) to accomplish a regulatory role and hence its possible evolution as an independent component. This last possibility could explain the observed over-representation of the periplasmic component of the TTT family in many micro-organisms such as *Bordetella bronchiseptica*, species of the genus *Advenella*, and *Rhodoplanes* [64–66].

Finally, it is important to stress that other regulatory mechanisms could modulate the expression of *dctPQM* either directly or through the DctS/DctR system. Our data suggest that under phototrophic growth conditions, a reduction of the expression of this operon seems to be necessary to achieve a proper redox balance. This observed reduction

of the *dctPQM* promoter, is in agreement with a global study that analysed the transcriptome of *R. sphaeroides* during the transition from photoheterotrophic to heterotrophic growth. In these experiments the induction of four clusters of genes annotated as TRAP-type transporters of C4 dicarboxylates was observed [67]. Given that in these experiments the carbon source was succinic acid, it was presumed that at least one of these transport systems should specifically transport this compound. Our data show that RSP0910-RSP0912 that were strongly expressed and induced after the shift, encode the succinic transporter, DctPQM. Interestingly, it has been recently shown that in *R. sphaeroides*, the small non-coding RNA SorY, is a negative regulator of the periplasmic component of a TRAP transporter system (TakP), which is involved in the uptake of an unidentified alpha-ketoacid. It has been proposed that the control of TakP mediated by SorY reduces photooxidative stress by adjusting the metabolic flux to reduce the amount of NADH formed in the TCA cycle [68]. Therefore, it is conceivable that the expression of *dctPQM* could be controlled by other regulatory elements, to achieve a precise redox balance during photosynthetic growth.

Funding information

This work was partially supported by DGAPA-PAPIIT grant IG200420. Verónica Sánchez-Ortiz was supported during her studies by a fellowship from CONACyT (No de becarío 255115).

Acknowledgements

We thank Aurora Osorio, Teresa Ballado and Javier de la Mora for technical support. Georgina Diaz and Daniel Garzón for valuable help with antibody production and animal care, and Molecular Biology Unit IFC-UNAM for sequencing facilities. This study is part of the requisites to obtain a doctoral degree by VS (Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

Maintenance and use of animals were in accordance with the Guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999). All experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Research Advisory Committee (CICUAL, Protocol ID 146), from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and under International Laws of ethical care and use of animals (National Research Council (U.S.) et al., 2011).

References

- Uندن G, Kleefeld A. C4-Dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth. *EcoSal Plus*. American Society for Microbiology; 2016.
- Imhoff JF. *The Phototrophic Alpha Proteobacteria*, 3 ed. Springer-Verlag New York; 2006.
- Janausch IG, Zientz E, Tran QH, Kroger A, Uندن G. C4-Dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2002;1553:39–56.
- Uندن G, Wörner S, Monzel C. Cooperation of secondary transporters and sensor kinases in transmembrane Signalling: the DctA/DcuS and DcuB/DcuS sensor complexes of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* 2016;68:139–167.
- Davies SJ, Golby P, Omrani D, Broad SA, Harrington VL et al. Inactivation and regulation of the aerobic C(4)-dicarboxylate transport (dctA) gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;181:5624–5635.
- Janausch IG, Kim OB, Uندن G. DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch Microbiol* 2001;176:224–230.
- Karinou E, Compton EL, Morel M, Javelle A. The *Escherichia coli* SLC26 homologue YchM (DauA) is a C(4)-dicarboxylic acid transporter. *Mol Microbiol* 2013;87:623–640.
- Engel P, Kramer R, Uندن G. Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *J Bacteriol* 1992;174:5533–5539.
- Six S, Andrews SC, Uندن G, Guest JR. *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *J Bacteriol* 1994;176:6470–6478.
- Mulligan C, Kelly DJ, Thomas GH. Tripartite ATP-independent periplasmic transporters: application of a relational database for genome-wide analysis of transporter gene frequency and organization. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007;12:218–226.
- Mulligan C, Fischer M, Thomas GH. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:68–86.
- Forward JA, Behrendt MC, Wyborn NR, Cross R, Kelly DJ. TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1997;179:5482–5493.
- Zientz E, Bongaerts J, Uندن G. Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (dctSR genes) two-component regulatory system. *J Bacteriol* 1998;180:5421–5425.
- Golby P, Davies S, Kelly DJ, Guest JR, Andrews SC. Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C4-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1999;181:1238–1248.
- Abo-Amer AE, Munn J, Jackson K, Aktas M, Golby P et al. DNA interaction and phosphotransfer of the C4-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004;186:1879–1889.
- Janausch IG, Garcia-Moreno I, Lehnen D, Zeuner Y, Uندن G. Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive two-component system DcuSR of *Escherichia coli*. *Microbiology* 2004;150:877–883.
- Steinmetz PA, Wörner S, Uندن G. Differentiation of DctA and DcuS function in the DctA/DcuS sensor complex of *Escherichia coli*: function of DctA as an activity switch and of DcuS as the C4-dicarboxylate sensor. *Mol Microbiol* 2014;94:218–229.
- Wörner S, Strecker A, Monzel C, Zeltner M, Witan J et al. Conversion of the sensor kinase DcuS of *Escherichia coli* of the DcuB/DcuS sensor complex to the C4-dicarboxylate responsive form by the transporter DcuB. *Environ Microbiol* 2016;18:4920–4930.
- Witan J, Bauer J, Wittig I, Steinmetz PA, Erker W et al. Interaction of the *Escherichia coli* transporter DctA with the sensor kinase DcuS: presence of functional DctA/DcuS sensor units. *Mol Microbiol* 2012;85:846–861.
- Valentini M, Lapouge K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol* 2013;15:1707–1716.
- Madigan MT, Jung DO. An overview of purple bacteria: systematics, physiology and habitats. In: Hunter CND F, Thurnauer MC, Beatty JT (editors). *The Purple Phototrophic Bacteria Vol 28 from Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer Science & Business Media; 2008; 2008.
- Clayton RK, Clayton BJ. Relations between pigments and proteins in the photosynthetic membranes of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta* 1972;283:492–504.

23. Cohen-Bazire G, Siström WR, Stanier RY. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* 1957;49:25–68.
24. Siström WR. The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Gen Microbiol* 1962;28:607–616.
25. Imam S, Noguera DR, Donohue TJ. Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Syst Biol* 2013;7:89.
26. Hamblin MJ, Shaw JG, Curson JP, Kelly DJ. Mutagenesis, cloning and complementation analysis of C₄-dicarboxylate transport genes from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol* 1990;4:1567–1574.
27. Shaw JG, Hamblin MJ, Kelly DJ. Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C₄-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol* 1991;5:3055–3062.
28. Wyborn NR, Alderson J, Andrews SC, Kelly DJ. Topological analysis of DctQ, the small integral membrane protein of the C₄-dicarboxylate TRAP transporter of *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;194:13–17.
29. Hamblin MJ, Shaw JG, Kelly DJ. Sequence analysis and interposon mutagenesis of a sensor-kinase (DctS) and response-regulator (DctR) controlling synthesis of the high-affinity C₄-dicarboxylate transport system in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet* 1993;237:215–224.
30. del Campo AM, Ballado T, de la Mora J, Poggio S, Camarena L et al. Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FliM proteins. *J Bacteriol* 2007;189:8397–8401.
31. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley; 1987.
32. Lanzer M, Bujard H. Promoters largely determine the efficiency of repressor action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8973–8977.
33. Ind AC, Porter SL, Brown MT, Byles ED, de Beyer JA et al. Inducible-expression plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:6613–6615.
34. Servín-Gonzalez L, Sampieri AI, Cabello J, Galván L, Juárez V et al. Sequence and functional analysis of the *Streptomyces phaeochromogenes* plasmid pJV1 reveals a modular organization of *Streptomyces* plasmids that replicate by rolling circle. *Microbiology* 1995;141:2499–2510.
35. Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* 1993;127:15–21.
36. Ballado T, Camarena L, Gonzalez-Pedrajo B, Silva-Herzog E, Dreyfus G. The hook gene (*flgE*) is expressed from the *flgBCDEF* operon in *Rhodobacter sphaeroides*: study of an *flgE* mutant. *J Bacteriol* 2001;183:1680–1687.
37. Davis J, Donohue TJ, Kaplan S. Construction, characterization, and complementation of a Puf- mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 1988;170:320–329.
38. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 1988;70:191–197.
39. Girard L, Brom S, Davalos A, Lopez O, Soberon M et al. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 2000;13:1283–1292.
40. Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8447–8451.
41. Bao K, Cohen SN. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev* 2001;15:1518–1527.
42. Harlow E, Lane D. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–685.
44. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350–4354.
45. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 2010;5:725–738.
46. Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-Ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 2013;29:2588–2595.
47. Inui M, Nakata K, Roh JH, Vertes AA, Yukawa H. Isolation and molecular characterization of pMG160, a mobilizable cryptic plasmid from *Rhodobacter blasticus*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:725–733.
48. Richardson DJ, King GF, Kelly DJ, Mcewan AG, Ferguson SJ et al. The role of auxiliary oxidants in maintaining redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Arch Microbiol* 1988;150:131–137.
49. Spero MA, Brickner JR, Mollet JT, Pisithkul T, Amador-Noguez D et al. Different functions of phylogenetically distinct bacterial complex I isozymes. *J Bacteriol* 2016;198:1268–1280.
50. Gordon GC, McKinlay JB. Calvin cycle mutants of photoheterotrophic purple nonsulfur bacteria fail to grow due to an electron imbalance rather than toxic metabolite accumulation. *J Bacteriol* 2014;196:1231–1237.
51. Tichi MA, Tabita FR. Maintenance and control of redox poise in *Rhodobacter capsulatus* strains deficient in the Calvin-Benson-Bassham pathway. *Arch Microbiol* 2000;174:322–333.
52. Tichi MA, Meijer WG, Tabita FR. Complex I and its involvement in redox homeostasis and carbon and nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 2001;183:7285–7294.
53. Gibson J. Uptake of C₄ dicarboxylates and pyruvate by *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J Bacteriol* 1975;123:471–480.
54. Gopel Y, Gorke B. Interaction of lipoprotein QseG with sensor kinase QseE in the periplasm controls the phosphorylation state of the two-component system QseE/QseF in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2018;14:e1007547.
55. Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6708–6712.
56. Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Aoki S, Machida Y. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J Biol Chem* 1993;268:26552–26558.
57. Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Deray I, Raze D et al. The periplasmic binding protein of a tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J Mol Biol* 2005;351:799–809.
58. Neiditch MB, Federle MJ, Pompeani AJ, Kelly RC, Swem DL et al. Ligand-induced asymmetry in histidine sensor kinase complex regulates quorum sensing. *Cell* 2006;126:1095–1108.
59. Cheung J, Hendrickson WA. Crystal structures of C₄-dicarboxylate ligand complexes with sensor domains of histidine kinases DcuS and DctB. *J Biol Chem* 2008;283:30256–30265.
60. Zhou YF, Nan B, Nan J, Ma Q, Panjikar S et al. C₄-dicarboxylates sensing mechanism revealed by the crystal structures of DctB sensor domain. *J Mol Biol* 2008;383:49–61.
61. Piepenbreier H, Fritz G, Gebhard S. Transporters as information processors in bacterial signalling pathways. *Mol Microbiol* 2017;104:1–15.
62. Asai K, Baik SH, Kasahara Y, Moriya S, Ogasawara N. Regulation of the transport system for C₄-dicarboxylic acids in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 2000;146 (Pt 2):263–271.
63. Graf S, Schmieden D, Tschauer K, Hunke S, Unden G. The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C₄-dicarboxylates in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2014;196:1084–1093.

64. Antoine R, Jacob-Dubuisson F, Drobecq H, Willery E, Lesjean S *et al.* Overrepresentation of a gene family encoding extracytoplasmic solute receptors in *Bordetella*. *J Bacteriol* 2003;185:1470–1474.
65. Rosa LT, Springthorpe V, Bianconi ME, Thomas GH, Kelly DJ. Massive over-representation of solute-binding proteins (SBPs) from the tripartite tricarboxylate transporter (TTT) family in the genome of the α -proteobacterium *Rhodoplanes* sp. Z2-YC6860. *Microb Genom* 2018;4
66. Wubbeler JH, Hiesl S, Schuldes J, Thurmer A, Daniel R *et al.* Unravelling the complete genome sequence of *Advenella mimi-gardefordensis* strain DPN7T and novel insights in the catabolism of the xenobiotic polythioester precursor 3,3'-dithiodipropionate. *Microbiology* 2014;160:1401–1416.
67. Arai H, Roh JH, Kaplan S. Transcriptome dynamics during the transition from anaerobic photosynthesis to aerobic respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* 2008;190:286–299.
68. Adnan F, Weber L, Klug G. The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biol* 2015;12:569–577.
69. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1648–1652.

Edited by: J. Stülke and F. M. Commichau

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.

Table S1. Oligonucleotides used in this work

For Δ dctPQM

dctPQMA1 GCTCTAGATCCATCAGCGCATAGACC
dctPQMA2 GCGAATTCACGACGTGGCTGAACTTG
dctPQMB1 GCGAATTCTCCTCCATCGTGCTCATC
dctPQMB2 GCTCTAGAGCTCTTCTATCCGGTGATGAA

For Δ dctR

dctRupFw GCTCTAGAAACAGCCGGGTCAAGCA
dctRupRv GCGAATTC AAGCAGATCGCCGACA
dctRdownFw GCCAATTCGAGGCGAAGAGGAACGAGA
dctRdownRv GCTCTAGAGCGCATGAGCTGAACCA

For pRK_dctPQM and pIND_dctPQM

dctPQMF GCGGATCCTCGCGACTGGCAAGGAAGG
dctPQMR GCGAATTCGCGGTCAGCGCATGCCCA
pINDPQMR CCCAAGCTTGCGGTCAGCGCATGCCCA

For pRK_dctR

dctRupFw GCTCTAGAAACAGCCGGGTCAAGCA
dctRcompRv CCCAAGCTTCTGAACATCTGCCGCAC

For pBADHisDctR

dctRA CCGGAATTCACAGGGTGCCTCCATATCAT
dctRB CCCAAGCTTTCATCCTGATCCTGAGCG

For pINDdctP

dctPQMF GCGGATCCTCGCGACTGGCAAGGAAGG
pBADdctPRv CCCAAGCTTTCGGATGGGTCAGTTGGTCC

For pBADHis-DctP

pBADdctPFw CCGGAATTCAGCCGATCGTCATCAAGTTCAG
pBADdctPRv CCCAAGCTTTCGGATGGGTCAGTTGGTCC

For BBgus_rpdctPQM

rpdetPQM1 GCTCTAGAGCGTGCGCCCGCCTGCCGGC
rpdetPQM2 CGGAATTCCTGCCAGAGCGGCGAGGCTGCG

For BBgusrpdctSP

rpdetSPF CGGAATTCGCGTGCGCCCGCCTGCCGGC
rpdetSPR GCTCTAGACCTGCCAGAGCGGCGAGGCTGCG

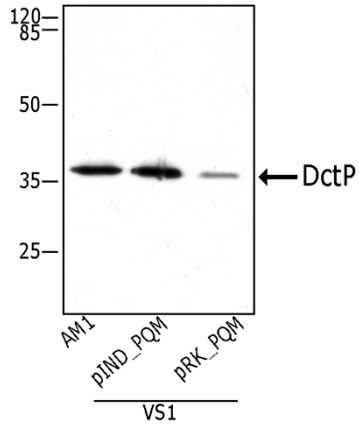


Fig. S1. Western blot analysis of DctP. Total cell extracts of the indicated strains were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and tested against α -DctP. Migration of the molecular mass markers is shown on the left margin

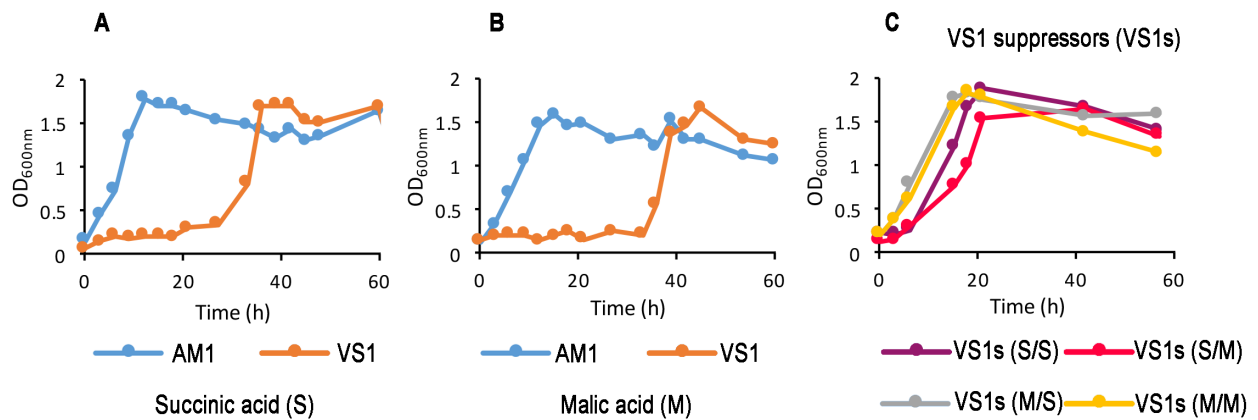
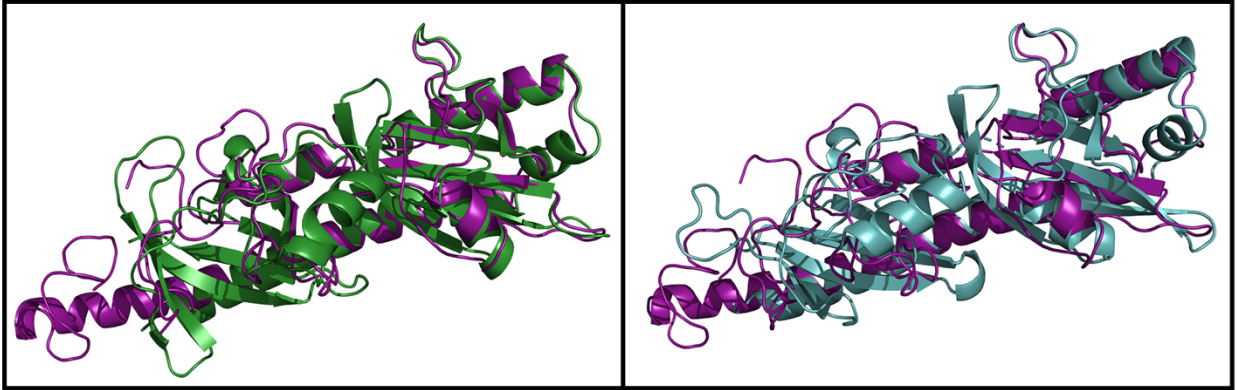


Fig. S2. Growth curves of strains AM1 and VS1 ($\Delta dctPQM::hyg$) in Sistrom's minimal medium containing either succinic acid (S) or malic acid (M) as a carbon source (panels A and B). Growth curves of cells obtained from the stationary phase of VS1 cultures in succinic (S) or malate (M) and re-growth in the indicated carbon source (panel C).

A)



Model

DctS *R. sphaeroides* / DctB *S. meliloti*

Model

DctS *R. sphaeroides* / DctB *V. cholerae*

B)

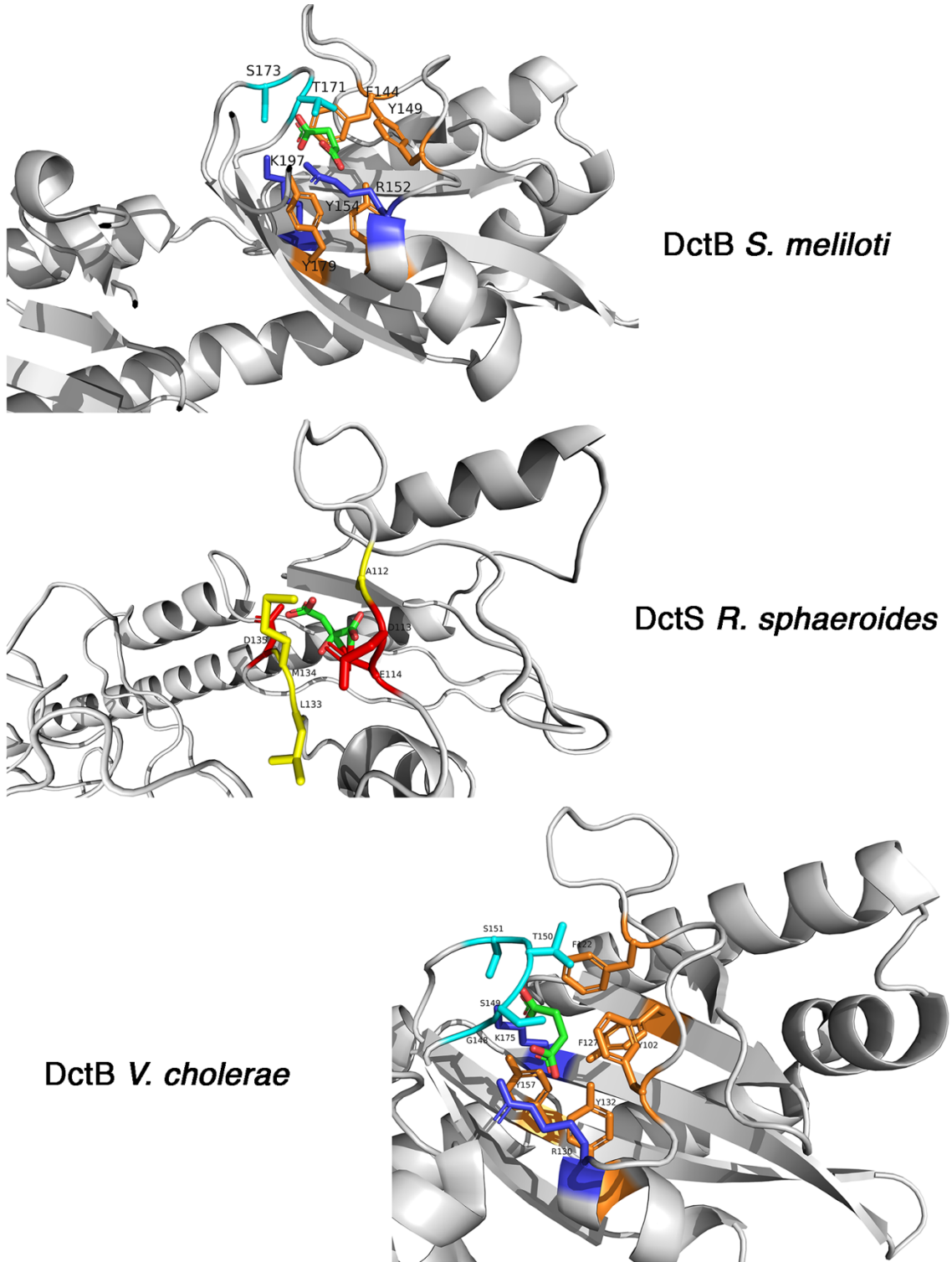


Fig. S3. Structural model of the periplasmic domain of DctS from *R. sphaeroides*. Tertiary structure prediction was carried out with I-Tasser as described in Methods. A) The modeled tertiary

structure of DctS from *R. sphaeroides* (magenta) superimposed with the structure of DctB from *S. meliloti* (green) is shown on the left panel. This last structure corresponds to ID:3E4Q from the protein data bank (PDB). On the right panel, the modeled tertiary structure of DctS from *R. sphaeroides* (magenta) superimposed with the structure of DctB from *V. cholerae* (cyan). This structure corresponds to PDB ID: 3BY9. The template modeling score (TM-score) of these structural alignments was 0.74 (*R. sphaeroides*/*S. meliloti*) and 0.67 (*R. sphaeroides*/*V. cholerae*). TM-score has a value from 0 to 1, where 1 indicates a perfect match.

B) Succinate-binding site of DctB from *S. meliloti* (PDB ID: 3E4O); predicted malate-binding site of DctS from *R. sphaeroides*, the labelled residues are the positions predicted by COACH; Succinate-binding site of DctB from *V. cholerae* (PDB ID:3BY9). Residues are shown in blue, for arginine and lysine (positively charged); orange, for phenylalanine and tyrosine (aromatics); cyan, serine and threonine (polar uncharged); yellow, for alanine, leucine and methionine (non-polar aliphatic); red, for aspartic acid and glutamic acid (negatively charged). The ligand-binding site predicted for DctS from *R. sphaeroides* showed a C-score of 0.08. This score ranges from 0 to 1, where a higher score indicates a more reliable prediction.

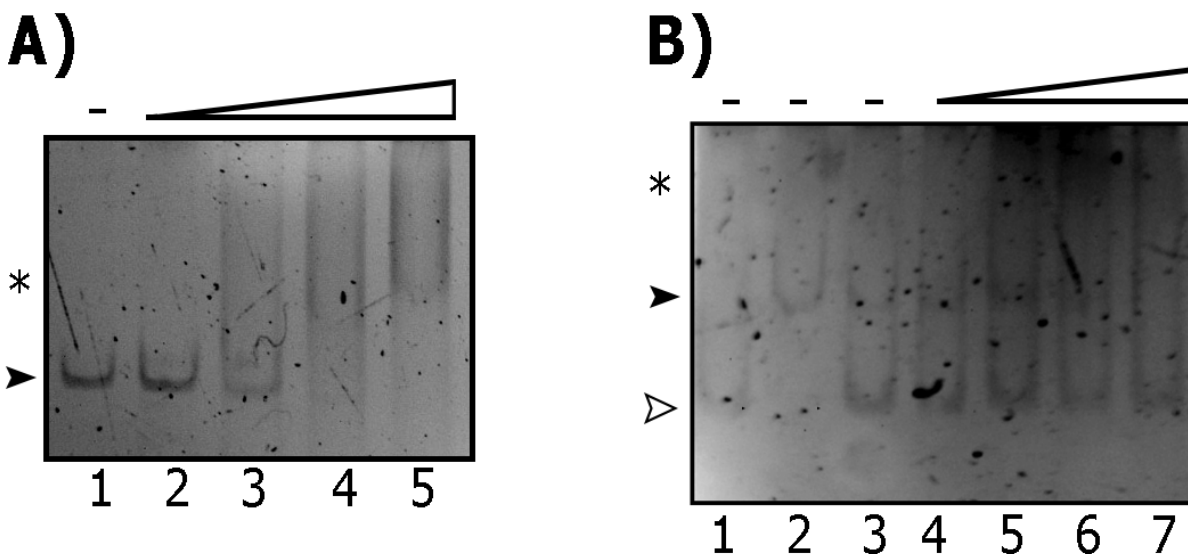


Fig. S4. Electrophoretic mobility shift of the *dct* promoter region by DctR_{D53E}. Panel A, *dct* promoter region (210 bp) without the addition of DctR_{D53E} (-). The black arrowhead shows the

migration of the free DNA fragment. Increasing amounts of DctR_{D53E} were included at 0.5, 1, 2 and 3 μg , lines 2 to 5, respectively. The asterisk indicates the region of the shifted complexes. Panel B, an unspecific DNA fragment of 100 pb without DctR (line 1), the *dct* promoter region of 210 pb without DctR (line 2), the two mixed DNA fragments without DctR (line 3), DNA fragments with increasing amounts of DctR were included at 0.5, 1, 2 and 3 μg (lines 4 to 7). The black and white arrowheads show migration of the free DNA fragments of either the *dct* promoter region or the unspecific DNA fragment, respectively.