

CFN.5
TL
1989
EJ. 2

CFN5
TL
1989
EJ. 2



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

*Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del C. C. H.*

**BUSQUEDA Y CARACTERIZACION GENETICA
DE SISTEMAS ALTERNATIVOS PARA LA
NITROGENASA EN RHIZOBIACEAS**

T E S I S

*Que para obtener el título de
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
p r e s e n t a*

Maria Brenda Valderrama Blanco

México, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**Búsqueda y caracterización genética de sistemas
alternativos para la nitrogenasa en Rhizobiaceas.**

María Brenda Valderrama Blanco

A mis papas, hermanos y David.
Por estricto orden de aparición.

LA REALIZACION DE ESTA TESIS NO HUBIERA SIDO
POSIBLE SIN EL APOYO DEL CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE
FIJACION DE NITROGENO A TRAVES DE SU DIRECCION, EN LA FORMA
DE BECAS DE HOSPEDAJE Y ALIMENTACION A LO LARGO DE LOS
ULTIMOS AÑOS DE LA LICENCIATURA.
ASIMISMO AGRADEZCO LA BECA ESPECIAL DE LICENCIATURA Y
BECA TESIS QUE RECIBI DE LA DGAPA DE LA UNAM EN EL
PERIODO DE 1985 A 1987.

Agradezco a Rafael Palacios, Mario Rocha, Carlos Arias y Guillermo Dávila su ayuda en la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios.

Especialmente a Jaime Mora su crítica severa y generosa durante el desarrollo del proyecto.

A Maluye, su amistad.

A mis amigos Oscar, Lorenzo, Carmen, Lupita, Agustín, Susi, Jaime, Hiram y Saúl, unas experiencias sensacionales.

A todo el Departamento de Ecología Molecular, especialmente a Yolanda y Jorge.

A todo el Departamento de Genética Molecular.

A todo el Departamento de Biología Molecular de Plantas, especialmente a Miguel.

A Memo, por corregir la ortografía.

A David, por todo lo anterior y todo lo demás.

INTRODUCCION

Cuando dos organismos con igual capacidad para realizar una serie de funciones entran en competencia por un habitat, utilizan el potencial de variación intrínseco a cada uno de ellos para proliferar preferencialmente a expensas de los otros.

La accesibilidad a nutrientes es una de las causas más probables de competencia en una población de microorganismos. No todos los nutrientes se encuentran distribuidos homogéneamente en la corteza terrestre, más bien, es frecuente encontrar vastas regiones que carecen o se encuentran limitados de uno o más elementos esenciales para la vida.

El carbono y el nitrógeno no son la excepción, ya que es difícil encontrarlos como compuestos asimilables en el suelo. Contrariamente, son muy abundantes en la atmósfera en forma de CO_2 y N_2 .

Tanto el nitrógeno como el carbono son compuestos indispensables para la vida en la tierra, y la necesidad de adquirirlos permitió la creación de estrategias metabólicas sofisticadas, como lo son la fotosíntesis y la reducción del dinitrógeno.

Ambas estrategias se generaron tempranamente en la escala filogenética y gracias a ellas existe vida en la tierra, pues son las únicas entradas netas de nitrógeno y carbono en la biósfera. A diferencia de la fotosíntesis que fué adquirida en algún momento por los eucariotes, la fijación de nitrógeno es exclusiva de procariotes. Son muchas las especies bacterianas que pueden llevar a cabo esta reacción, pero las que representan la mayor entrada de nitrógeno utilizable son aquellas que interaccionan con plantas verdes, especialmente las leguminosas (Postgate, 1980).

Postgate (1988) sugiere en base a evidencias geológicas que el origen del proceso de fijación de nitrógeno tal como lo conocemos, data probablemente de hace $1.5-3.5 \times 10^9$ años. La aparición de este mecanismo surgió como una respuesta al cambio de la atmósfera de reductora a oxidante, con la depleción concomitante de amoníaco en la biósfera.

Se conoce como fijación de nitrógeno a la actividad que cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio llevado a cabo en los seres vivos.

La estructura propuesta para el complejo enzimático de la nitrogenasa es la siguiente: la nitrogenasa reductasa (componente II o proteína Fe), es un dímero de subunidades idénticas de M_r de 30,000 y contiene un solo centro de Fe_4S_4 . Reduce a la nitrogenasa (componente I o proteína MoFe) por pasos sucesivos de un solo electrón en una reacción en la cual MgATP se hidroliza a MgADP. Se requieren de 8 pasos para llevar a cabo esta reacción:



La nitrogenasa es un tetramero $\alpha_2\beta_2$ con una M_r de 220,000 y contiene dos centros del cofactor hierro-molibdeno (FeMoco), con una estequiometría $\text{MoFe}_{5-8}\text{S}_{4-10}$ y cerca de 16 iones hierro y azufre ácido-lábiles (Smith et al, 1988).

El conocimiento que tenemos de la genética de la fijación de nitrógeno provino esencialmente del estudio del sistema de Klebsiella pneumoniae, pues solo hasta 1980 comenzaron a analizarse otros sistemas (Merrick, 1988). Por esto, K. pneumoniae se considera el sistema modelo y punto de referencia obligado para lo que se encuentre en cualquier otro organismo.

En K. pneumoniae los genes nif forman un regulón contenido en una sola región. Este regulón consta de 21 genes contenidos en un fragmento de 23 kilobases del cromosoma (fig. 1a).

Se conoce la función de la mayor parte de estos genes (tabla 1), y excepto para nifJ se ha analizado su secuencia nucleotídica.

Las proteínas del sistema y sus genes, particularmente nifH, han demostrado estar altamente conservados en gran número de bacterias fijadoras de nitrógeno no relacionadas filogenéticamente (tablas 2 y 3).

Todos los sistemas de nitrogenasa que se encontraron por muchos años compartían gran cantidad de características entre sí (secuencia de aminoácidos y nucleótidos, uso de cofactores, mecanismos de reacción, etc.). De hecho se consideró que este sistema, llamado convencional, era el único que se iba a encontrar.

Sabemos que la actividad convencional de reducción de dinitrógeno es susceptible de alteración a varios niveles moleculares.

El sencillo hecho de utilizar un cofactor metálico la hace dependiente estricta de la presencia de dicho elemento en las concentraciones adecuadas. La presencia o ausencia de fuentes utilizables de nitrógeno orgánico también repercute en la actividad del sistema con la participación de las redes regulatorias del metabolismo nitrogenado.

Es indudable la sensibilidad de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno molecular, así como la necesidad de éste oxígeno para mantener tasas de respiración que permitan sostener los altos requerimientos energéticos de la nitrogenasa.

Algunos organismos han encontrado la forma de contender con estas necesidades antagónicas desarrollando varias estrategias de contingencia.

Una de estas estrategias, es la utilización de sistemas alternativos diferentes al de la nitrogenasa convencional, encuentran-

dose cada vez más organismos donde esto sucede.

Durante mucho tiempo se enfocó la atención de los especialistas del área al estudio del proceso en organismos fijadores en vida libre. Esto es comprensible dada la complejidad de las relaciones simbióticas.

El organismo más estudiado a nivel de la bioquímica y la biofísica de la reducción de dinitrógeno fue A. vinelandii. Por muchos años se utilizó como punto de referencia lo encontrado en este organismo (Burris 1988). Cuando parecía que el interés del área se movía definitivamente a los sistemas simbióticos, Bishop et al (1980) demostraron que Azotobacter aún tenía mucho que decir.

Analizando reversiones fenotípicas de cepas que habían perdido los genes estructurales de la nitrogenasa convencional en A. vinelandii, lograron detectar la actividad y presencia de un grupo de proteínas que compensaban la pérdida del sistema nifHDK.

A partir del primer reporte, pasaron 6 años en los cuales el grupo de Bishop se concretó a demostrar bioquímicamente la existencia de otras proteínas con actividad de nitrogenasa.

Actualmente se han identificado dos sistemas alternativos para la actividad de la nitrogenasa en A. vinelandii. Estos sistemas son diferentes entre sí y con respecto al convencional tanto genética como bioquímicamente.

El trabajo posterior de Bishop et al. (1988) se ha concentrado en la purificación y caracterización de las proteínas componentes de este sistema. Eady et al. (1988) se han dedicado a la caracterización molecular de los genes que codifican para todos los sistemas, tanto en A. vinelandii como en A. chroococcum.

La caracterización de los tres sistemas ha sido un trabajo completo y de una profundidad evidente, yendo de la biología molecular a la biofísica y la bioquímica de cada uno.

A partir de una cepa de A. vinelandii que contenía una delección de los genes nifHDK convencionales se purificó una nitrogenasa que contiene vanadio como cofactor. Esta nitrogenasa-2 es un tetramero con un peso de 210,000 D y esta compuesto de dos sub-unidades distintas: una con un peso de 50,000 D y la otra de 55,000 D. Esta nitrogenasa-2 contiene dos átomos de vanadio, 23 átomos de fierro y 20 grupos sulfhidrilo. El acetileno es muy mal sustrato para reducción en la nitrogenasa-2, pero aún así se ha detectado la capacidad de reducirlo a etano así como a etileno. Capacidad que no se observa en la nitrogenasa-1 (Eady et al, 1987).

La nitrogenasa reductasa-2 es un dímero r_2 de un peso molecular de 62,500 D y contiene 4 átomos de fierro y 4 azufres sulfhidrilo por dímero. Similaridades del espectro de resonancia magnética y

estudios de cinética de pegado de ATP indican un grado considerable de conservación de estructura en los sitios de transferencia de electrones entre la nitrogenasa reductasa-1 y la nitrogenasa reductasa-2. Esto permite la formación de sitios activos en nitrogenasas híbridas dentro de los componentes del sistema 1 y 2 de A. chroococcum, actividad que no siempre se observa al combinar componentes de la nitrogenasa convencional de diferentes organismos.

En 1986 se detectó en A. chroococcum una actividad equivalente a la de la nitrogenasa alternativa encontrada por Bishop (Robson, 1986)

La nitrogenasa reductasa de la Nitrogenasa-2 está probablemente codificada por una secuencia homóloga a nifH llamada nifH2. Contigua a este gene hay una fase de lectura abierta que codifica para una probable ferredoxina. Esta región solo se transcribe en condiciones de deprivación de molibdeno, cuando la actividad de Nitrogenasa-2 se expresa. El fragmento de EcoRI de 8kb que contiene el gene de la ferredoxina también contiene regiones de homología con nifD y nifK convencionales.

Al secuenciar 4kb de la región de DNA que hibridiza con nifD y nifK se identificaron tres fases de lectura abierta. Una de ellas con homología con nifD (vnfD) se localizó después de nifH2 y del gen de la ferredoxina. Un poco más lejos se encontró una fase de lectura abierta con homología con nifK (vnfK). Entre vnfD y vnfK se encuentra una tercera fase de lectura abierta que codifica una proteína de un peso de 13,275 (vnfG) (Robson et al, 1988).

El patrón de péptidos de la nitrogenasa-2 en geles desnaturalizantes presenta las dos subunidades de 50,000 y 55,000 D esperadas, así como otro péptido de bajo peso molecular. La estequiometría de éste péptido con respecto a α y β es de 1:1:1. Este péptido parecería ser el producto de la fase de lectura abierta que se encuentra entre vnfD y vnfK, y que se cree fuertemente acoplado a estos dos a nivel de transcripción. Tomando en cuenta esto, la estructura oligomérica de la nitrogenasa-2 parecería ser $\alpha_2\beta_2\delta_2$, donde δ es el producto de la fase de lectura abierta vnfG (Eady et al, 1987).

La identificación de vnfD y vnfK como los genes que codifican para las subunidades α y β de la nitrogenasa-2, fué confirmada por la identidad de la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de nucleótidos de estos genes con el fragmento amino terminal de las subunidades de la nitrogenasa-2. vnfD codifica para el polipéptido α (50 kD) y vnfK codifica para la subunidad β (55 kD). La secuencia de aminoácidos derivada de la fase de lectura abierta que se encuentra entre vnfD y vnfK coincide con la secuencia del polipéptido de bajo peso molecular que copurifica con la nitrogenasa-2.

Recientemente se purificó en A. vinelandii una nitrogenasa que aparentemente no contiene molibdeno ni vanadio (Robson et al,

1986). Esta segunda nitrogenasa alternativa (nitrogenasa-3) consiste de dos componentes. El componente I está integrado por dos subunidades diferentes que se ensamblan en al menos dos configuraciones activas: $\alpha_2\beta_2$ y $\alpha_1\beta_2$. El componente II está integrado por dos subunidades del mismo peso (Chisnell et al, 1988).

El contenido de hierro y azufre ácido-lábil en las dos configuraciones de las subunidades es $\text{Fe}_{24}\text{S}_{18}$ para $\alpha_2\beta_2$ (M_r 216,000) y Fe_{11}S_9 para $\alpha_1\beta_2$ (M_r 158,000).

El componente II está integrado por dos proteínas con idéntica M_r (32,500) contiene 4Fe y 4S por dímero.

La actividad de este tercer sistema no ha sido detectada en A. chroococcum.

La nitrogenasa-3 es diferente a la nitrogenasa-1 en lo siguiente: 1) Una alta tasa de evolución de H_2 en presencia de nitrógeno molecular; 2) Baja tasa de reducción de acetileno; 3) Altas tasas continuas de evolución de H_2 en presencia de acetileno; 4) Formación incrementada de etileno en concentraciones de acetileno mayores a 10 kPa; 5) Formación de etano en adición a etileno durante la reducción de acetileno; 6) Baja tasa de reducción de acrilonitrilo; 7) Baja proporción de propano/propileno formado durante la reducción de acrilonitrilo.

Esta nitrogenasa-3 se conoce como la Fe-nitrogenasa por contener este metal como cofactor.

Jacobson et al (1986) encontraron tres fragmentos de DNA genómico homólogos a nifH en A. vinelandii. En estudios de expresión diferencial, encontraron que uno de las dos copias extras de nifH se expresa en condiciones de depleción de molibdeno. Utilizando un detector específico para nifH2 de A. chroococcum localizaron un transcrito homólogo al gen de la ferredoxina que se detectó en este organismo contiguo al gen nifH2. Ambos transcritos comigran en A. vinelandii y es probable que sean el mismo.

Bishop et al clonaron y determinaron la secuencia de la tercera región de homología con nifH de A. vinelandii. En esta clona se detectan cuatro fases de lectura abierta, correspondiendo la primera de ellas a nifH3, la segunda a nifD3, la tercera es de 396pb y no se le ha encontrado homología con otros genes nif, y la cuarta corresponde a nifK3. Una mutante que carece del fragmento carboxi-terminal de nifH3 y del amino-terminal de nifD3 es incapaz de crecer en medios sin nitrógeno deficientes de molibdeno, pero crece en medios sin nitrógeno suplementados con Mo o V.

Los pesos moleculares para los productos de traducción predichos para estas secuencias son 29,865D para nifH3, 58,347D para nifD3 y 51,137D para nifK3.

El patrón de regulación de la expresión de las tres nitrogenasas en A. vinelandii parece ser el siguiente:

-Se requiere Mo para la expresión de la nitrogenasa-1.

-El Mo suprime la expresión de ambas nitrogenasas alternativas (2 y 3).

-Probablemente se requiera V para la expresión de la nitrogenasa-2.

-V suprime la expresión de la nitrogenasa-3.

La presencia de sistemas alternativos en Azotobacter abre la posibilidad de encontrarlos en otros organismos.

Una pregunta interesante es el como surgieron los sistemas alternativos en la evolución de A. vinelandii. A continuación se mencionan algunas características de cada uno de los tres sistemas que nos permiten proponer una hipótesis sobre los mecanismos moleculares y probables causas fisiológicas que favorecieron la aparición de estos sistemas.

Se ha designado sistema convencional al primero que se demostró que se encuentra en todos los organismos fijadores de nitrógeno.

En un artículo publicado en 1985, Hennecke et al analizan los coeficientes de similitud de siete secuencias diferentes de nifH y los coeficientes del patrón de huellas del RNA ribosomal 16S de la misma especie o de otras muy cercanas. Los arboles dendríticos producidos por cada una de las correlaciones son muy parecidos entre sí.

Basandose en la suposición de que DNA ajeno no está sujeto a presiones mutacionales especiales en un nuevo fondo genético, concluyen que la evolución de nifH y el rRNA 16S ha sido concurrente. Esto es, las secuencias de nifH estudiadas se han encontrado en el mismo fondo genético desde que éste existe.

Aunque este estudio está limitado a un pequeño numero de especies, arguye fuertemente en contra de la existencia de transferencia horizontal.

La homología a nivel de secuencia de aminoácidos en A. vinelandii entre nifD1 y nifD3 es del 29%, y entre nifK1 y nifK3 es del 30%. Resulta interesante el observar que este porcentaje de conservación es tan bajo como la existente entre dos organismos tan diferentes como C. pasteurianum y Anabaena sp 7120 (tabla 3). En lo referente a A. chroococcum, la diferencia entre nifD1 y nifD2 es de 52%, y entre nifK1 y nifK2 es de 53%.

A pesar de las diferencias tan notables a nivel de secuencia entre los sistemas alternativos y los convencionales en la misma célula, se pueden crear nitrogenasas híbridas activas mezclando componentes. Esto no sucede si se mezclan componentes de diferentes bacterias del mismo género (Chisnell, 1988).

Los esquemas de la disposición relativa de los genes nifHDK de

cada uno de los tres sistemas (figura 1b), sugieren fuertemente que en la generación de los nuevos sistemas participó un evento de duplicación.

La disposición del sistema 1 es parecida a lo encontrado en otros organismos (Quinto et al, 1985; Reidel et al, 1979). Probablemente se trate también de un operón.

Este sistema 1 es razonablemente eficiente, necesitando la energía de 4.8 ATP para translocar un par de electrones al sustrato.

En algún momento en la evolución de Azotobacter surgió alguna presión externa (¿ausencia de molibdeno?) que favoreció la selección de una duplicación con la inserción de una fase de lectura abierta entre nifD y nifK. El producto de esta fase de lectura abierta es un péptido que, sin intervenir directamente en el centro activo de la nitrogenasa, permite que se realice la actividad de reducción de dinitrógeno en ausencia de molibdeno como cofactor. El precio de esta capacidad es que la eficiencia de translocación de electrones baja 4.6 veces, necesitando ahora 22.3 ATP/2e⁻.

Suponiendo que el evento anterior realmente haya existido, el sistema 3 surgió entonces directamente del sistema 1, por medio de un evento de duplicación seguido de un evento de inserción.

La creación del sistema 2 se explica más fácilmente partiendo del sistema 3 que del sistema 1. En el caso más sencillo (partiendo del sistema 3), basta con un evento de duplicación, seguido de un evento de inserción que coloque bajo el control transcripcional de nifH al gen estructural de una ferredoxina.

El donador de electrones fisiológico de la nitrogenasa reductasa-1 en A. vinelandii es una flavodoxina codificada por el gen nifF (Deistung et al, 1985).

Al acoplarse la transcripción de una ferredoxina con nifH2, se pudo obtener que la eficiencia de alocación de electrones ascendiera 4 veces (5.5 ATP/2e⁻), prácticamente la misma que el sistema convencional. La ferredoxina probablemente está sustituyendo a la flavodoxina codificada por nifF, favoreciendo un potencial electroquímico diferente.

Aunque la proposición anterior parezca razonable, el hecho de que el sistema 2 contenga vanadio en el centro activo de la nitrogenasa hace probable la ocurrencia de otro evento, el de que la recuperación de la eficiencia de translocación de electrones al sustrato haya sido generada por una mutación en el centro activo y que la inserción de la ferredoxina ya no sea importante.

Cualquiera de los dos eventos que sea el real, hay que considerar que el surgimiento del sistema 2 parece derivar del sistema 3, y consistió probablemente de tres eventos: una duplicación del sis-

tema 3, la inserción del gene de la ferredoxina y una mutación en el centro activo.

Es muy interesante el hecho que A. chroococcum solo posea los sistemas 1 y 2. ¿Perdió los genes del sistema 3, o solo se convirtieron en secuencias sin expresión? No existe en la literatura ningún reporte en que se muestren las hibridizaciones de los genes del sistema 3 contra DNA total de A. chroococcum.

En A. vinelandii los tres sistemas son excluyentes, de tal manera que se requiere la presencia de molibdeno para expresar la nitrogenasa-1 y suprimir la expresión de los otros dos sistemas. Se requiere la presencia de vanadio para inducir la nitrogenasa-2 y suprimir la nitrogenasa-3, esta última, se expresa solamente en ausencia de estos dos metales.

Aparte de la regulación por metales, se ha estudiado la correlación de la expresión de los genes de los tres sistemas con las vías generales de regulación nif y ntr.

Experimentos de inserción de tn-5 en diferentes genes nif han demostrado que solo algunas de estas mutaciones afectan a los tres sistemas mientras que otras mutaciones solo afectan a los sistemas alternativos (Joerger et al, 1986).

Se ha demostrado que los siguientes genes se requieren para la expresión y actividad de los tres sistemas:

*nifM - el producto de este gen se requiere para la maduración de la nitrogenasa-reductasa (Kennedy et al, 1986).

*nifB - se piensa que el producto de este gen cataliza un paso común en el ensamblaje de los centros activos (Joerger et al, 1986).

*rpoN (ntrA) - se han encontrado las secuencias consenso en los sistemas 1 y 2, pero muy probablemente se encuentren también en el 3 (Toukdarian et al, 1986).

Los siguientes genes afectan la expresión de uno o dos de los sistemas :

*ntrC - se requiere el producto funcional de este gen para la expresión del sistema 2 en A. vinelandii (Santero et al, 1988). Sin embargo, no basta la expresión de ntrC de A. vinelandii en E. coli para activar fusiones transcripcionales de nifH2 (Merrick, 1988). Es probable la existencia de un acoplador para que actúe ntrC.

*nifA - se requiere una copia funcional de este gen para la expresión de los sistemas 1 y 3 en A. vinelandii (Santero et al, 1988). nifH2 carece de las secuencias activadoras para nifA.

*nfrX - recientemente se detectó la presencia de este gen en A.

vinelandii (Santero et al, 1988). Mutaciones en nfrX son nif^- y pueden complementarse en K. pneumoniae con la expresión constitutiva de nifA. Se requiere de la presencia del producto de nfrX para la expresión de los sistemas 1 y 3.

*nifH - se requiere el producto de este gen para la síntesis activa de la nitrogenasa-1. No es necesario que la nitrogenasa reductasa este activa, pues mutantes en nifM no afectan la actividad de la nitrogenasa-1 (Filler et al, 1986; Robinson et al, 1987).

En A. vinelandii parecen haberse dividido en dos las vías de regulación que operan en K. pneumoniae. Mientras que en este organismo los productos de ntrC y nifA se requieren para la expresión de nifH, en A. vinelandii se requiere de uno o de otro para la expresión diferencial de los sistemas de nitrogenasa.

Aparentemente los sistemas 1 y 3 se regulan exclusivamente por nifA y nfrX y no requieren del sistema de ntrC.

Por otro lado, la expresión de nifH2 depende de ntrA y ntrC, pero es independiente de nifA y nfrX. Sin embargo, probablemente exista una proteína equivalente a NifA que sirva de acoplador entre ntrC y nifH2.

El estudio de los mecanismos de regulación vuelven a acomodar en un solo grupo a los sistemas 1 y 3, quedando el sistema 2 separado.

Si el modelo de evolución de los tres sistemas propuesto anteriormente es cierto, estas evidencias regulatorias vienen a apoyar la idea que el sistema 2 es el más alejado del sistema 1; tanto que cambió su regulación dependiente de nifA por una regulación exclusivamente dependiente del sistema del metabolismo nitrogenado.

A diferencia de otros organismos, en A. vinelandii el producto de nifA no es sensible a oxígeno (Bali et al, 1988), por lo cual no se puede decir que nifH2 haya cambiado la regulación por oxígeno por la regulación por nitrógeno.

En conclusión, la regulación en Azotobacter es más compleja de lo que es en otros organismos, no solo por el número de genes involucrados, sino por las interacciones entre ellos.

No es Azotobacter el único diazótrofo que presenta más de una copia de los genes estructurales para la nitrogenasa.

En Nostoc commune también se han identificado dos secuencias homólogas a nifH diferentes de nifHDK (DeFrancesco et al, 1988).

Se ha reportado que en Rhodospseudomonas capsulata existen varias copias de los genes que codifican para la nitrogenasa reductasa. Estas copias podrían funcionar en diferentes condiciones ambien-

tales, ya que se han podido aislar reversiones fenotípicas para la fijación de nitrógeno (Scolnik et al, 1984).

En C. pasteurianum, Chen et al (1986) reportan la presencia de más de una secuencia homóloga a nifH. De hecho clonan tres de ellas y las caracterizan por secuenciación de nucleótidos.

La copia nifH1 presenta una coincidencia del 100% entre la secuencia de aminoácidos deducida con respecto a la reportada para la proteína pura, por lo que se consideró el gene estructural de la nitrogenasa reductasa convencional.

La existencia de las otras copias se concluyó por medio de la caracterización de las otras dos secuencias que presentaban homología con nifH. La segunda copia se llamó nifH2 y es una fase de lectura abierta de 816 nucleótidos. La comparación de la secuencia entre esta copia y la llamada nifH1 da una tasa de homología de 90%. A nivel de la secuencia de aminoácidos deducida, la tasa de homología es del 92%.

La tercera de estas secuencias se llamó nifH3, y de la secuencia de aminoácidos deducida se observa una tasa de homología de 77% con respecto a la secuencia de nifH1.

La comparación de la secuencia de nucleótidos con respecto a otros organismos (tabla 3) presenta una tasa de homología no mayor del 50%, , mientras que a nivel de secuencia de aminoácidos deducida es del 60%. Esta diferencia se atribuye a un uso sesgado del código genético en C. pasteurianum.

No se tiene ninguna evidencia con respecto a la funcionalidad de las copias extra encontradas.

Dentro de las bacterias capaces de entrar en simbiosis (Rhizobiaceas) donde se han encontrado mas de una copia del gen que codifica para la nitrogenasa reductasa se encuentran A. caulinodans (Norel et al, 1985) y R. phaseoli (Quinto et al, 1982)

En un primer acercamiento a la caracterización de los genes estructurales para la nitrogenasa en la cepa de A. caulinodans ORS571 se hibridizó DNA total contra el plásmido pSA30, que contiene los genes nifHDK, nifY y parte de nifE de K. pneumoniae. Se estableció la existencia de un cluster nifHDKY así como la presencia de una segunda copia de nifH en otro lugar del genoma. No se encontraron señales homólogas a nifD o a nifK fuera del cluster (Norel et al, 1985).

Posteriormente se llevó a cabo la clonación de cada uno de las dos secuencias homólogas a nifH. El análisis de la secuencia de nifH1 reveló una fase de lectura abierta cuyo producto corresponde a una nitrogenasa reductasa convencional. Siguiendo a este gene, se detectó el comienzo de otra fase de lectura abierta cuya secuencia coincide con el principio de un nifD convencional

(Norel et al, 1987).

La secuencia de nucleótidos de nifH2 revela una extensa homología con nifH1. Solo se encuentran cambiados seis nucleótidos, cinco de esos cambios afectan la tercera base de sus respectivos codones, de forma que solamente uno de ellos ocasiona un cambio en la secuencia de aminoácidos.

Se realizó un análisis funcional de estas dos secuencias, resultando lo siguiente: una doble mutante por delección en nifH1 y nifH2 tiene fenotipo $\text{Nif}^-\text{Nod}^+\text{Fix}^-$, indicando que no existe otra copia funcional de nifH aparte de las dos mutadas. El fenotipo en vida libre de las mutantes sencillas sugiere que en la cepa silvestre la copia de nifH1 realiza el 70% de la actividad total de fijación de nitrógeno, mientras que la copia nifH2 realiza el 30% restante.

Contrariamente, el fenotipo simbiótico indica que la copia nifH2 realiza el 80% de la fijación de nitrógeno, mientras que la copia nifH1 realiza un 15%. Dado que la secuencia no justifica una diferencia tan grande en actividad, se considera que la diferencia es a nivel de regulación transcripcional (Norel et al, 1987).

Recientemente se determinó la localización de fases de lectura abierta contiguas a la secuencia de nifH2 (Kaminski et al, 1988).

Inmediatamente al final de esta se localizó una fase de lectura abierta necesaria para la fijación de nitrógeno. Posee un promotor consenso nif y se transcribe individualmente. Codifica para un péptido de 107 aminoácidos al que no se le ha encontrado función. Se le llamó nifQ.

Contiguo a éste se identificó una fase de lectura abierta que presenta homología con fixABC. Se clonó y caracterizó esta región comprobando que en efecto se trata de una copia de los genes fixABC. Mutaciones en este operón tienen fenotipo $\text{nif}^-\text{fix}^-\text{nod}^+$ (Kaminski et al, 1988), indicando que probablemente se trate de la única copia.

No se detectó ninguna homología con los genes nifDK en esta región.

Por último comentaré sobre la presencia de más de una copia de nifHDK en R. phaseoli. En 1982 Quinto et al describieron la presencia de tres copias de nifH en R. phaseoli. Las tres copias son idénticas y constan de una fase de lectura abierta que codifica para 296 aminoácidos (Quinto et al, 1985).

Se secuenció parte de la región previa a la fase de lectura abierta, encontrándose que las tres regiones comparten los motivos regulatorios desde el codón de inicio hasta el nucleótido -96. A partir de aquí, la secuencia de una de las regiones (llamada región c) diverge, mientras que las otras dos permanecen iguales.

En dos de las tres regiones se encontraron evidencias de la existencia de los genes estructurales para la nitrogenasa, nifDK, pero por medio de dos estrategias diferentes (hibridización contra detectores específicos y formación de heteroduplex), no se pudo demostrar la existencia de estos genes en la tercer región (región c).

Experimentos de mutagénesis dirigida en cada una de las tres regiones indican que ninguna de ellas es indispensable para la actividad de fijación de nitrógeno en planta, sino que más bien parecería que fueran expresadas simultanea e indistintamente (Quinto et al, 1987).

Para terminar quisiera comentar acerca de la diferencia entre reiteración y sistema alternativo. En R. phaseoli encontramos que por lo menos dos de las tres regiones comparten no solamente características estructurales, sino que regulatoriamente son indistinguibles. Esto es lo que llamariamos una reiteración. Mientras tanto, lo que encontramos en los otros sistemas podría haber sido un reiteración en sus orígenes, pero la derivación de las secuencias las llevó a adquirir otras características, tanto regulatorias como estructurales. Lo que sucedió fué la creación de sistemas alternativos.

ANTECEDENTES DIRECTOS Y OBJETIVOS

Nuestro grupo se ha interesado en el estudio del metabolismo del nitrógeno, en particular en la asimilación de amonio en R. phaseoli.

Se han llevado a cabo varios proyectos para cubrir el área bajo diferentes puntos de vista. Una buena parte del trabajo ha sido sobre la fisiología de la asimilación de amonio (Bravo et al, 1988a y 1988b; Mora et al, 1988a). Sin embargo también se ha incidido en la genética y en la bioquímica del proceso (Bravo et al, sometido a publicación; Mora et al, 1988a).

La idea fundamental en el desarrollo de estos proyectos es la consideración de la relación planta-bacteria como un intercambio de carbono fijado por nitrógeno fijado.

Utilizando Neurospora crassa como modelo, ha quedado asentada la profunda interacción entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno. De hecho se demostró que el metabolismo de la glutamina regula el flujo de carbono celular (Mora et al, 1988b).

La premisa que se utilizó para abordar la interacción planta-bacteria fué el considerar que el establecimiento de la simbiosis no depende exclusivamente de un intercambio de señales químicas o de la obediencia a un programa genético, sino que se trataba de un reconocimiento del estado fisiológico de ambos organismos lo que disparaba las otras señales.

Bajo este enfoque se encontraron algunas condiciones de cultivo en las cuales la bacteria semeja características de bacteroide (Bravo et al, 1988a). Posteriormente se demostró que manipulando el metabolismo del nitrógeno de la bacteria se modificaban las capacidades de la simbiosis (Bravo et al, 1988b).

El obtener un estado metabólico que simule el del bacteroide nos permitiría librarnos de la complejidad de la simbiosis, reproduciendo ex-planta los cambios de estrategias metabólicas de la bacteria que se dan durante la interacción.

La característica mas sobresaliente de los bacteroides es la expresión de la actividad de nitrogenasa. Hasta la fecha, la capacidad de las Rhizobiaceas de crecer con dinitrógeno sólo se ha observado en Bradyrhizobium (Agarwal et al, 1975), Azorhizobium (Gebhardt et al, 1984) y Rhizobium spp cowpea (Keister, 1975).

Nosotros hemos llevado a cabo una serie de experimentos que indican fuertemente que R. phaseoli (cepa CFN42) presenta actividad de nitrogenasa ex-planta. Interesantemente, esta capacidad se conserva en cepas que han perdido el plásmido simbiótico (CFN2001). Los experimentos que se realizaron fuero de tipo fisiológico, y comprendían el monitoreo de varios parámetros que indicaban fijación de nitrógeno.

Sin embargo, la manipulación del organismo ha representado fuertes problemas en la reproducibilidad del fenómeno, de forma que buscamos otras alternativas para la caracterización del mismo.

De esta manera surgió el proyecto cuyos resultados presento en esta tesis. La idea fundamental es la búsqueda de sistemas alternativos diferentes al convencional para la fijación de nitrógeno en vida libre.

Posteriormente se incluyó a B. japonicum, dentro de la búsqueda, ya que consideramos tenía fuertes posibilidades de presentar un sistema alternativo que podría servirnos de modelo.

Las evidencias originales que sustentaron esta idea vienen de fuera del grupo y consisten en una observación de O'Gara et al, (1984) con respecto al efecto de mutaciones asm sobre la fijación de nitrógeno.

Dado que la vía de asimilación de amonio en B. japonicum es la de GS-GOGAT, mutaciones que afectaran esta última actividad, deberían de causar nódulos inefectivos. En efecto, el fenotipo simbiótico de la cepa mutante CJ9 es Nod⁺Fix⁻. Lo interesante fue el encontrar que el fenotipo de fijación de nitrógeno ex-planta permanecía silvestre (Nif⁺).

Nuestro interés se concentró en determinar si efectivamente la mutación afectaba la regulación de la expresión de la nitrogenasa, o si se trataba de dos sistemas alternativos.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS:

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados o construidos en éste trabajo están descritos en la tabla 4.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO:

El medio de cultivo utilizado para crecer las cepas de R. phaseoli fué PY (peptona de caseína 0.5%, extracto de levadura 0.3%, CaCl_2 7mM) (Noel et al 1984). El medio utilizado para crecer E. coli y A. tumefaciens fué LB (peptona de caseína 1.0%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0%, NaOH 10N 0.25ml/l.). El medio para crecer B. japonicum fué MSY (extracto de levadura 0.5%, manitol 1.0%, MgSO_4 0.02%, NaCl 0.01%, K_2HPO_4) (Somasegaran et al. 1985). Para solidificar los medios se utilizó agar al 1.5%.

Cuando se requirió, se utilizaron los siguientes antibióticos. Para R. phaseoli: Estreptomicina (Sm) 200µg/ml, Nalidixico (Nal) 20µg/ml, Rifampicina (Rif) 50µg/ml. Para E. coli: Estreptomicina (Sm) 100µg/ml, Ampicilina (Amp) 30µg/ml. Para B. japonicum: Espectinomicina (Sp 100µg/ml). Para A. tumefaciens: Estreptomicina (Sm) 100µg/ml, Rifampicina (Rif) 50µg/ml, Kanamicina (Km) 60µg/ml.

Los crecimientos de R. phaseoli, A. tumefaciens y B. japonicum se llevaron a cabo a 30°C, mientras que E. coli se creció a 37°C.

EXTRACCION DE DNA TOTAL DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

Se crecen las cepas bacterianas en 5 ml del medio adecuado hasta la fase estacionaria. Se centrifuga todo el cultivo en microfuga y se lavan las células con 1 ml de TE 50/20. Se resuspenden en 0.4 ml de TE 50/20 y se les agrega 50µl de proteinasa K (2.5mg/ml) mezclando por inversión. Se agrega 50µl de SDS 10% y se mezcla por inversión. Incubar 60' a 37°C y pasar el lisado 3 veces por una aguja del no. 25. Extraer dos veces con fenol-cloroformo-isoamílico 24:24:1 y dos veces con cloroformo. Para precipitar los nucleicos se adicionan 15µl de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol 100%, y se conserva toda la noche a -20°C. Centrifugar 15'a 4°C y resuspender en 0.5ml de TE 10/1, reprecipitar adicionando dos volúmenes de etanol al 100%. Incubar 2hs. a -20°C. Centrifugar, secar por centrifugación al vacío y resuspender en 0.5ml de TE 10/1. Incubar 30' a 37° con 10µl de RNAasa 10mg/ml.

De una preparación típica se obtienen cerca de 250µg de DNA total digerible en una noche con 5-7 unidades de enzima de restricción por microgramo de DNA.

PURIFICACION DE DNA DE PLASMIDOS RECOMBINANTES:

Los plásmidos recombinantes fueron purificados según el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979).

TRANSFORMACION DE E. coli:

Se crece la cepa receptora en 3ml de LB toda la noche. Se inocula 0.5ml de este precultivo en 50ml de LB y se agita a 37°C hasta alcanzar una D.O.⁶⁵⁰ de 0.6. Se cosechan las células 5'a 6 krpm a 5°C. Se lava con el mismo volumen de NaCl 10mM. Se resuspende la pastilla en buffer de transformación y se incuba en hielo por 20'. Se bajan las células 10' a 6krpm a 5°C y se resuspenden en 1ml de buffer de transformación. Mezlar 0.2ml de células competentes con 0.1ml de buffer conteniendo 50 a 500 ng del plásmido. Incubar 1h en hielo. Dar un choque de calor de 1' a 42°C. Dejar expresando 1h en 3ml de LB a 37°C sin agitación. Hacer las diluciones convenientes en MgSO₄ 10mM + tween 0.01%. Espatular 0.1ml de las muestras en los medios de selección. Buffer de transformación: CaCl₂ 75mM, Tris-HCl 5mM pH7.4, MgCl₂ 5mM.

DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN:

El DNA purificado fué digerido siguiendo las indicaciones y utilizando las mezclas de reacción recomendadas por los proveedores (Amersham y Promega).

ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE DNA:

Las muestras de DNA total digeridas se ajustaron a una concentración de 5µg por carril. Todos los geles contienen agarosa al 1% en tris-acetatos (Maniatis et al, 1982) y se corrieron toda la noche a 30V a 4°C. Se trataron y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de manera similar a lo reportado por Southern (Southern, 1975), excepto que todos los geles se transfirieron simultaneamente a dos membranas, de forma que se obtienen dos filtros idénticos para cada gel.

PREPARACION DE COLONIAS PARA HIBRIDIZACION in situ:

Se prepararon las colonias según Hahn et al, 1984.

CONDICIONES DE HIBRIDIZACION:

Hibridizaciones a alta severidad - Se llevaron a cabo prehibridizando (1ml/carril) e hibridizando (0.5ml/carril) 24hs a 65°C sin agitación (Maniatis et al, 1982). En el caso de las hibridizaciones en colonia, sólo se prehibridizó por 2 hs.

Se utiliza la misma mezcla para todos los casos:

Fosfato de sodio pH 6.4	0.1M
Denhardt	10X
SSC	5X
DNA esperma de salmón	100µg/ml

Hibridizaciones a baja severidad - Se llevaron a cabo prehibridizando (1ml/carril) e hibridizando (0.5ml/carril) 24hs a 42°C con agitación. (Pawloski et al, 1987).

Mezcla de prehibridización:

SSC	6X
SDS	0.5%
Formamida	30%
Denhardt	5X
DNA esperma	200µg/ml

Mezcla de hibridización:

SSC	6X
EDTA pH 8.0	0.01M
Denhardt	5X
Formamida	30%
DNA esperma	200µg/ml

Los detectores (tanto plásmidos como fragmentos puros) se marcaron con ³²P-CTP por el procedimiento de "nick translation" (Rigby et al, 1977), utilizando los reactivos provistos por Amersham.

CONDICIONES DE LAVADO DE LAS HIBRIDIZACIONES:

Los filtros se lavaron dependiendo la severidad deseada.

Para alta severidad:

2x SSC	temp. amb.	15 min.
0.1x SSC + 0.1% SDS	55°C	30 min.
0.1x SSC	temp. amb.	15 min.

Para baja severidad:

2x SSC	temp. amb.	15 min.
2x SSC + 0.1% SDS	55°C	30 min.
2x SSC	temp. amb.	15 min.

Despues del primer lavado a 55°C se revisan los filtros con un detector Geiger, y dependiendo de la intensidad de la marca inespecifica de fondo se les da otro lavado. Normalmente las hibridizaciones de alta severidad requieren otro pulso de 30 min.

RESULTADOS

El objetivo de este trabajo es la caracterización de probables sistemas alternativos para nitrogenasa en Rhizobiaceas. Para realizar esto se decidió usar la estrategia de detección de secuencias homólogas al sistema convencional de R. phaseoli. Esta estrategia ha sido utilizada exitosamente por otros grupos con el mismo fin. (Norel et al, 1985; Souillard et al, 1988; Chen et al, 1986).

SUBCLONACION DEL pCQ12:

Para poder confiar en la detección inequívoca de secuencias homólogas a nifH, nifD o nifK, fué indispensable la clonación de cada uno de estos fragmentos en vehículos individuales. Dado que cada una de las tres regiones reiteradas de los genes para la nitrogenasa reductasa-nitrogenasa de la cepa CFN42 se encuentran clonadas por separado en el vehículo pBR328 (Quinto et al, 1982) (fig 2), y que el fragmento de SalI de 300pb interno de nifHa ya se encuentra clonado como derivado del vehículo pBR329 en el plásmido p15b, sólo fué necesario subclonar las regiones del plásmido pCQ12 (fig 2) que comprenden a los genes nifD y nifK.

Para llevar esto a cabo, se digirió el pCQ12 con la enzima de digestión SalI, ya que de esta forma se separan los genes nifD y nifK en dos fragmentos diferentes de 1.1 y 1.0 kb respectivamente. Se ligaron los insertos al vehículo pBR329 digerido también con SalI, y se transformó la cepa de E. coli MC1061 con esta preparación. La selección fué para todas las clonas que contuvieran al vector con inserto. Posteriormente se analizaron 100 transformantes por medio del método de hibridación en colonia, utilizando como detectores las bandas de 1.0 y 1.1 kb del pCQ12. Se obtuvieron 3 clonas para la banda de 1.1 y 2 para la de 1.0. Después de revisar el patrón de digestión con diferentes enzimas de restricción y el de hibridación contra el pCQ12 de estos dos grupos, se seleccionó una clona de cada uno y se les llamó p12D a la del inserto de 1.1kb y p12K a la del inserto de 1.0kb (fig 2)

Para definir cual de los dos fragmentos llevaba cual gen, se hibridó contra DNA total de B. japonicum, del cual se conoce el patrón de hibridación y es diferente nifD de nifK.

HIRIDACION DE DNA DE R. phaseoli CONTRA p15B, P12D Y p12K:

El primer diseño experimental consideraba la identificación de otras regiones homólogas a nifH, nifD y nifK en la cepa CE3 (derivada Sm^r de la cepa silvestre CFN42) pero la presencia de las copias originales podía evitar que se detectaran otras señales menos intensas. Para solucionar esto, se utilizó DNA de la cepa CFN2001, que es una derivada de la anterior, curada de los megaplásmidos A y D (simbiótico), y por lo tanto no contiene las copias reiteradas.

Se digirió DNA total de las cepas de R. phaseoli CE3 (silvestre) y de la derivada de ésta curada del plásmido simbiótico CFN2001, con diferentes enzimas de restricción. Los geles de estas digestiones se transfirieron por duplicado y ambos filtros de cada gel se hibridaron contra cada uno de los detectores, una de las réplicas a baja severidad y la otra a alta severidad.

En el caso de los plásmidos p12D y p12K, se marcaron radiactivamente los plásmidos completos. Con el fin de demostrar que las señales no se debían al vector, se realizó un control de hibridación contra pBR329 que resultó negativo (dato no mostrado). En el caso del p15B se utilizó el inserto separado del vehículo, para asegurar una buena incorporación específica dentro del fragmento de interés. Las réplicas de los filtros se expusieron a la misma cantidad de cuentas por minuto de los detectores marcados. La carga por carril de gel fue casi siempre de 5 millones de cpm, en algunos casos fue menor, dependiendo de la eficiencia de la reacción de marcaje, pero nunca menos de 3.5 millones de cpm por carril.

Los filtros se expusieron a -70°C por diferentes tiempos y se presentan las exposiciones más claras de cada uno de los juegos de filtros.

ANÁLISIS DE NUEVAS SEÑALES HOMÓLOGAS A nifH EN R. phaseoli:

En la figura 3 y 4 se presenta la hibridación del DNA de las cepas CE3 y CFN2001 contra el fragmento interno de nifH aislado del p15B. En los filtros hibridados a alta severidad, se detecta homología solamente contra la cepa CE3, coincidiendo con los tamaños reportados para las reiteraciones de este gen. La sobreexposición del filtro no revela bandas adicionales.

En la misma figura se presenta la réplica de este filtro hibridado contra nifH a baja severidad, aquí si se detecta un nuevo fragmento homólogo, en la cepa CFN2001. Esta señal se observa en las tres digestiones, dando bandas definidas de 3.2kb en BamHI, 2.7kb en EcoRI y 16.5kb en HindIII.

En la figura 4 se presenta la hibridación de DNA total de las cepas CE3 y CFN2001 contra el fragmento de 600 pb correspondiente a la segunda mtal de nifHb.

En esta figura se observa que la señal encontrada en ambas cepas es diferente de las convencionales, y que además coincide con la obtenida con el fragmento interno de 300 pb de nifHa como detector (figura 3).

Con el fin de determinar mas finamente la localización de esta secuencia dentro del genoma de R. phaseoli, se utilizó DNA de transconjugantes de A. tumefaciens conteniendo cada uno de los megaplásmidos de la cepa CE3 (a excepción del plásmido E), digerido con BamHI.

La figura 5 nos muestra los resultados del filtro hibridado a alta severidad contra nifH: solamente se identifica señal en los carriles correspondientes a la CE3 o a la GMI/pDCE3, correspondiendo el tamaño de las bandas a las regiones reiteradas.

En el caso del filtro hibridado a baja severidad, se observa que aparte de las bandas convencionales iguales a las vistas a alta severidad, solamente se detecta señal de hibridación en el carril de la CFN2001. Las bandas de alto peso molecular detectadas en todas las transconjugantes, se encuentran también en el DNA de la cepa padre, la GMI9023.

Estos resultados nos llevan a pensar que la región de homología a nifH que estamos estudiando se debe encontrar en el megaplásmido E o en cromosoma, como no existe transconjugante de A. tumefaciens con este plásmido o cepa curada de éste mismo, se hace necesaria la búsqueda de otra estrategia.

Más adelante se discutirán las perspectivas a corto plazo para resolver este problema.

ANÁLISIS DE NUEVAS SEÑALES HOMÓLOGAS A nifD Y nifK EN R. phaseoli:

Utilizando la misma estrategia que para la búsqueda de señales homólogas a nifH, se hibridó DNA total de las cepas CE3 y CFN2001 contra los plásmidos que contienen las secuencias codificadoras para nifD y nifK de R. phaseoli.

En la figura 6 se observan los resultados de la hibridación a alta severidad del DNA de estas cepas contra nifD. Se detectan las bandas correspondientes a las regiones a y b en la CE3 con bastante intensidad en todas las digestiones probadas. Sorprendentemente, también se detecta una señal en la cepa silvestre de tamaño semejante al correspondiente a la región c, en las diferentes digestiones.

En el caso de la réplica de este filtro hibridada a baja severidad, que se presenta en la misma figura, vemos con mayor claridad el mismo patrón de hibridación. Es evidente que la homología entre las tres regiones no es la misma, ya que la intensidad de las bandas es diferente entre sí, siendo la nueva señal la menos intensa de todas. Esto es obviamente diferente a los datos de la hibridaciones contra nifH (figs 3 y 4).

Con el fin de determinar si la correspondencia de tamaño de esta secuencia con la de la región c es coincidencia o no, se utilizó uno de los cósmidos clonados del plásmido simbiótico de la cepa CFN42 que contiene a la región c de la nitrogenasa (cGD28) como sustrato de hibridación contra el p12D. Asimismo, dentro del mismo gel se corrió DNA digerido con BamHI de todas las transconjugantes de A. tumefaciens por si en efecto, la señal no correspondía a la región c.

En la figura 7 vemos las hibridaciones a alta y baja severidad de estos filtros contra nifD. Tanto a alta como a baja severidad, es evidente que la señal de hibridación, se encuentra solamente en la transconjugante de A. tumefaciens con el plásmido simbiótico. También se observa claramente que nifD hibrida dentro del cósmido GD28 en la banda correspondiente a la región c.

Con respecto a las hibridaciones del DNA de la cepa CE3 contra nifK, en la figura 8 podemos ver los resultados tanto a alta como a baja severidad. En ambas condiciones se observan unicamente las señales correspondientes a las regiones a y b. Sobreexposición de estos filtros no reveló ninguna diferencia.

Aunque el resultado fué negativo, de todos modos se llevó a cabo la hibridación del DNA de las transconjugante de A. tumefaciens contra nifK a ambas severidades. En la figura 9 se muestran los resultados de este experimento. Aquí reproduce lo encontrado anteriormente, en que solo se prenden las regiones a y b en la CE3 y en GMI/pDCE3. No se detecta ninguna señal contra el cósmido GD28.

De estos resultados podemos concluir que aparentemente sí existe una copia de nifD en la región c, pero que por lo menos bajo nuestras condiciones no encontramos ninguna evidencia de la existencia de una copia de nifK en esta misma región.

Más adelante discutiremos las implicaciones de estas evidencias y algunas ideas para su caracterización posterior.

En los carriles con el DNA total de la cepa CFN2001 en las figuras 6 y 8, se observa una ligera señal de hibridación tanto con nifD como con nifK. En la digestión con EcorI, esta señal tiene un tamaño de aproximadamente 4kb y con HindIII de aproximadamente 8kb.

ANALISIS DE NUEVAS SEÑALES HOMOLOGAS A nifH EN B. japonicum:

En la introducción se señalaron las dudas que despierta el trabajo de O'Gara et al (1984) con respecto al comportamiento de su cepa mutante asm⁻ y el fenotipo de fijación de nitrógeno en vida libre.

Para tratar de resolver con otro enfoque esta duda, decidimos utilizar la misma estrategia que utilizamos con R. phaseoli, con la intención de identificar cualquier fragmento de homología a nifH que diera bases para la caracterización de un sistema alternativo en este organismo.

En la figura 10 podemos observar las hibridaciones contra el fragmento interno de 600pb de nifH del DNA de dos diferentes cepas de B. japonicum. La cepa CJ1 es la utilizada por O'Gara para el trabajo reportado en 1984. La cepa USDA110 es un aislado utilizado para preparar inoculantes, que no había sido estudiado hasta la fecha con técnicas de biología molecular.

En la hibridación a baja severidad (25% formamida) se pueden observar dos bandas en cada una de las cepas, la banda mayor, coincide con la reportada en tener un tamaño de 2.8kb, mientras que la de 2.0kb no ha sido detectada por otros grupos.

En la hibridación a mediana severidad (50% formamida), en la cepa CJ1 solamente se observa la banda de 2.8kb, mientras que en la cepa USDA110 se alcanzan a ver las dos bandas con intensidad equivalente. Esta hibridación no se ha llevado a cabo en condiciones de alta severidad.

ANALISIS DE PROBABLES SEÑALES HOMOLOGAS A nifD Y nifK EN B. japonicum:

En la figura 11 se presenta la hibridación de una de las cepas de B. japonicum (CJ1) contra el plásmido pCQ12, que lleva los genes nifH, nifD y nifK de la región b de R. phaseoli.

Esta hibridación se llevó a cabo en condiciones de baja severidad exclusivamente, y es solamente un dato indicativo de la presencia de otras secuencias interesantes.

De acuerdo a los mapas reportados para B. japonicum (fig 12), podemos caracterizar las diferentes bandas de hibridación de la siguiente manera: la banda de 6.0 kb corresponde a la secuencia de nifD, la de 2.8kb a la de nifH, la de 1.5kb a nifK. De este trabajo sabemos que la banda de 2.0kb corresponde a la otra secuencia homóloga a nifH. Por eliminación encontramos que la banda de 4.0kb no coincide con lo reportado hasta ahora, y abre la posibilidad de que sea parte de una nitrogenasa diferente que complemente al producto de la secuencia de 2.0kb. De esta forma tendríamos un sistema completo de fijación de nitrógeno diferente al convencional en B. japonicum.

DISCUSION

En este trabajo se describe la identificación de secuencias homólogas a los genes estructurales para la nitrogenasa (nifD y nifK) y para la nitrogenasa reductasa (nifH), diferentes a las reportadas en los sistemas convencionales de fijación de nitrógeno. El análisis se llevó a cabo en varias cepas de R. phaseoli y B. japonicum.

En la literatura se encuentran varios reportes recientes que tratan de la caracterización de secuencias homólogas pero diferentes al nifH convencional en organismos tan diversos como A. chroococcum (Robson et al, 1986), A. vinelandii (Jacobson et al, 1986), A. caulidonans (Norel et al, 1985, 1987), C. pasteurianum (Chen et al, 1986) y Nostoc commune (Defrancesco et al, 1988).

En A. vinelandii y A. chroococcum se ha demostrado que estas secuencias forman parte de un sistema alternativo para la fijación de nitrógeno, el cual se expresa en condiciones diferentes a aquellas donde funciona el sistema convencional (Robson et al, 1986; Norel et al, 1987; Bishop et al, 1988).

Para estos organismos se ha logrado determinar que la regulación de la expresión es alternativa para cada uno de los tres diferentes sistemas. Estos sistemas contienen secuencias homólogas a nifH, D y K (figura 1b). En A. caulinodans sólo se ha detectado otra copia de nifH (Norell et al, 1987).

De los tres genes estructurales que codifican para la nitrogenasa, el de nifH es el más conservado de todos ellos (tablas 2 y 3). Aún entre organismos tan lejanos filogenéticamente como arqueobacterias y bacterias del género Rhizobium, la homología es de un 50%, con identidad suficiente para detectarse por medio de hibridaciones.

Evidentemente existe un compromiso estructural con respecto a la función que ha restringido las posibilidades de derivación de nifH. Por esta razón, ha sido posible utilizar detectores heterólogos para la localización de los genes estructurales de la nitrogenasa reductasa. De hecho esta ha sido la estrategia utilizada por algunos grupos (Souillard et al, 1988; Quinto et al, 1985; Chen et al, 1986). Con respecto a los genes estructurales para la nitrogenasa (nifDK), este compromiso parece ser menos estricto, ya que mientras entre C. pasteurianum y R. phaseoli la homología en secuencia de aminoácidos para nifH es de 61%, para nifD es de 40% y para nifK es de 42% (tabla 2).

La metodología que manejamos en el desarrollo de este trabajo nos permite detectar secuencias que compartan cuando menos un 60% de homología con el detector. Bajo nuestras condiciones de severidad se obtuvieron los resultados que demuestran que la cepa de R. phaseoli CE3 contiene una secuencia homóloga diferente al gen nifH convencional fuera del plásmido simbiótico (figs 3 y 4).

La detección de esta secuencia puede llevarse a cabo usando el fragmento interno de 300pb (figura 3) ó el fragmento de 600pb correspondiente al 3' de nifH (figura 4). Ambos detectores dan una señal de intensidad equivalente bajo las mismas condiciones de hibridización, por lo que podemos suponer que la secuencia recién detectada posee baja homología extensiva a por lo menos el 80% de la secuencia codificadora para un nifH convencional. Esto disminuye la posibilidad de que se trate de una copia truncada de uno de los genes del plásmido simbiótico.

Se han reportado por lo menos dos trabajos en los cuales se demuestra que existen secuencias no involucradas con la fijación de nitrógeno que presentan homología a nivel de secuencia de nucleótidos con nifH.

El primero de estos trabajos (Hearst et al, 1985), define la presencia de una fase de lectura abierta homóloga a nifH que se encuentra dentro de la región que agrupa los genes fotosintéticos en R. capsulata. La homología es del 33% y a aparentemente se concentra alrededor de los sitios activos. Los autores no abundan en las implicaciones que esto pueda tener, y ni siquiera están seguros que está homología sea suficiente para dar una señal positiva de hibridación.

Recordemos que la función del producto de nifH es la de translocar electrones desde flavodoxinas o ferredoxinas a la nitrogenasa, o sea, que es un intermediario en una cadena de flujo de electrones. La fotosíntesis también es una cadena de flujo de electrones, aunque no del todo comparable a aquella en la que participa el producto de nifH. Viendolo de esta manera, es posible que se trate de un sistema con elementos comunes a cierto tipo de intermediarios de las cadenas de flujo de electrones. Inclusive pudieran ser dos derivados de un ancestro común.

Aparentemente este no es nuestro caso, pues aparte de que no se conoce ninguna evidencia de fotosíntesis en las Rhizobiaceas, nuestra señal de homología corresponde al 80% de la fase de lectura abierta de nifH convencional, que incluye bastante más secuencias que las de los sitios activos.

El otro trabajo mencionado (Schumann et al, 1986), presenta evidencias de la hibridación de un detector específico para nifH contra una región rica en genes ribosomales del genoma de R. capsulata. Al clonar y analizar por secuencia una de estas regiones, no encuentran ninguna fase de lectura abierta que pudiera tener suficiente homología con nifH como para considerarla una copia no expresada, parte de la intensidad de la señal que permitió su detección se debe únicamente a las múltiples copias de los genes ribosomales que comigran en los geles.

Experimentos preliminares llevados a cabo con DNA total de la cepa CE3 indican que aparentemente no se encuentra ninguna secuencia homóloga a genes ribosomales de E. coli en la región de

tamaño molecular donde detectamos la señal de hibridación contra nifH.

El tipo de experimentos que nos proponemos llevar a cabo para la caracterización de la secuencia homóloga a nifH encontrada en la cepa CFN2001, comprende la hibridación de DNA total de esta cepa contra detectores específicos para nifH provenientes de otros organismos, inclusive los correspondientes a los sistemas alternativos de A. vinelandii.

Asimismo consideramos necesario el asilamiento de esta secuencia, de preferencia en un fragmento lo suficientemente largo que permita el análisis de las secuencias adyacentes. Para esto, y por lo tenue de la señal de hibridación, hemos pensado en la construcción de un banco subgenómico del DNA de la cepa CFN2001.

La localización de la clona será por hibridación con el detector con el que encontremos mejor señal. Una vez obtenida la clona, se secuenciará y probablemente se utilice para la construcción de mutaciones en la cepa CE3.

Los experimentos realizados en las cepas CE3 y CFN2001 para la determinación de secuencias homólogas a nifD y nifK (figs 6 y 8) fuera del plásmido simbiótico no dan un resultado claro, pero aún quedaría pendiente demostrar la naturaleza de las bandas de hibridación tenues que se observan en algunos de los carriles tratados en condiciones de baja severidad. Planeamos llevar a cabo detecciones de secuencias homólogas a nifDK por medio del uso de las secuencias de los genes de los sistemas alternativos de A. vinelandii como detectores.

El detectar los elementos de un sistema equivalente al presente en el plásmido simbiótico sustentaría los resultados obtenidos sobre el crecimiento diazotrófico de la cepa CFN2001. Actualmente se está llevando a cabo trabajo por otras personas de nuestro laboratorio para definir las condiciones fisiológicas en las cuales observar este crecimiento diazotrófico.

Había sido establecido que en la cepa silvestre CE3 el gen estructural para la nitrogenasa reductasa (nifH) se encontraba reiterado tres veces (copia a, b y c), mientras que solo se encontraron dos copias de los de la nitrogenasa (nifD y nifK) en las regiones a y b. (Quinto et al, 1985) (fig 1).

Estos resultados se obtuvieron por medio de hibridaciones heterólogas con los genes equivalentes de Parasponia Rhizobium, no encontrando señal de hibridación en la región c contra nifD ó nifK (datos no publicados). Los experimentos de heteroduplex realizados por Quinto et al (1985), corroboraban la falta de una homología extensiva al término de nifH de las regiones a y b con respecto a la c.

Al utilizar los plásmidos p12D y p12K como detectores contra el genoma de la CE3 encontramos que se detecta una señal no repor-

tada contra nifD (fig 6), la cual demostramos se encuentra precisamente en la región c (fig 7). Esta señal es lo suficientemente fuerte para detectarse en condiciones de alta severidad.

Experimentos equivalentes usando nifK como detector, no nos proporcionan ninguna señal comparable ni en la región c ni en el resto del genoma (fig 8).

Como se puede observar en la figura 1, la falta de similitud entre las regiones a y b y la región c, se extiende también a la diferencia en el patrón de restricción. Los resultados presentados en este trabajo indican que la organización genética en la región c puede ser tan diferente a las otras dos, como para poder contener por lo menos una copia extra de nifD diferente a las reportadas.

Se conoce que las secuencias previas a la región c no conservan los motivos regulatorios que se presentan en las otras dos (Quinto et al, 1985). En cuanto a la funcionalidad de esta región, Romero et al. (1987) demuestran que la doble mutación polar en las regiones a y b suprime toda incorporación de nitrógeno a la planta huésped, indicando que la copia c no tiene participación en la actividad de fijación de nitrógeno en planta. Sin embargo, Morett et al. (1988) presentan evidencias positivas de la expresión de esta región en planta, utilizando fusiones transcripcionales con lacZ. Sin embargo, corroboran los resultados de Romero et al, al demostrar que esta construcción no solo no reduce la actividad total de nitrogenasa, sino que la incrementa. Los autores interpretan este resultado como consecuencia de un rearrreglo genómico sufrido en esta cepa (EM403).

Las evidencias anteriores sugieren que la región c contiene por lo menos dos de los tres elementos estructurales necesarios para producir actividad de reducción de nitrógeno molecular. La existencia del tercer elemento (un gen equivalente a nifK), queda todavía como posibilidad abierta, así como la identificación de estados fisiológicos en los que se expresen estos genes. Actualmente se considera el llevar a cabo más experimentos para la caracterización física y funcional de esta región c.

Uno de estos experimentos es la clonación y análisis por secuencia de nucleótidos de las regiones contiguas a nifHc. Asimismo, se considera la construcción de fusiones transcripcionales en esta región con el fin de monitorerar su expresión.

Analizando los datos presentados por Quinto et al (1985), Romero et al (1988) y Morett et al (1988) se abre la posibilidad de identificar esta región c como un sistema críptico.

Sería un sistema críptico pues no parece expresarse de manera coordinada junto con las otras dos copias, aún en condiciones restrictivas de crecimiento (Romero et al, 1988). Aunque los datos de Morett et al (1988) indican que esta copia sí se ex-

presa, no hay que olvidar que esta cepa sufrió un rearrreglo que generó una cuarta copia de nifH.

Para concluir, los datos obtenidos en B. japonicum son indicativos que la presencia de otras copias homólogas a nifHDK no son exclusivas del género *Rhizobium*.

En este caso contamos con la evidencia de una señal homóloga a nifH y otra señal homóloga a nifDK. Los experimentos necesarios para profundizar en la caracterización de estos datos implican la definición de fragmentos más pequeños que permitan adjudicar la señal a nifD o nifK específicamente. Asimismo consideramos el aislar estos fragmentos y el caracterizarlas por medio de la obtención de su secuencia nucleotídica.

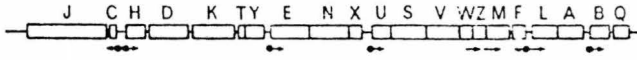


FIGURA 1a - ORGANIZACION DE LA REGION nif
EN K. pneumoniae.

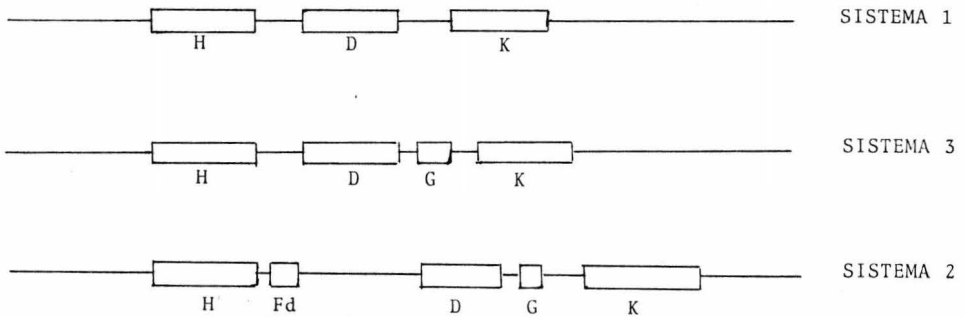


FIGURA 1b - LOCALIZACION RELATIVA DE LOS GENES
ESTRUCTURALES PARA LOS TRES SISTEMAS DE
NITROGENASA EN A. vinelandii.

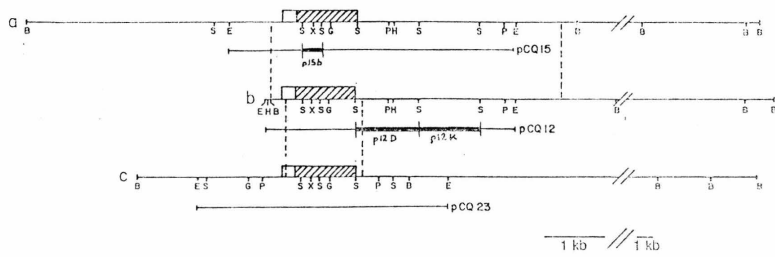


FIG 2 -- MAPA CON ENZIMAS DE RESTRICCION DE LAS REGIONES *nifH* DE LA CEPA CPN42. LAS PORCIONES MARCADAS INDICAN LA SECUENCIA DEL GEN *nifH*.

LAS CAJAS CERRADAS INDICAN LAS REGIONES SUBCLONADAS EN LOS PLASMIDOS p15b, p12D y p12K.

Tomado de Quinto et al, 1985.

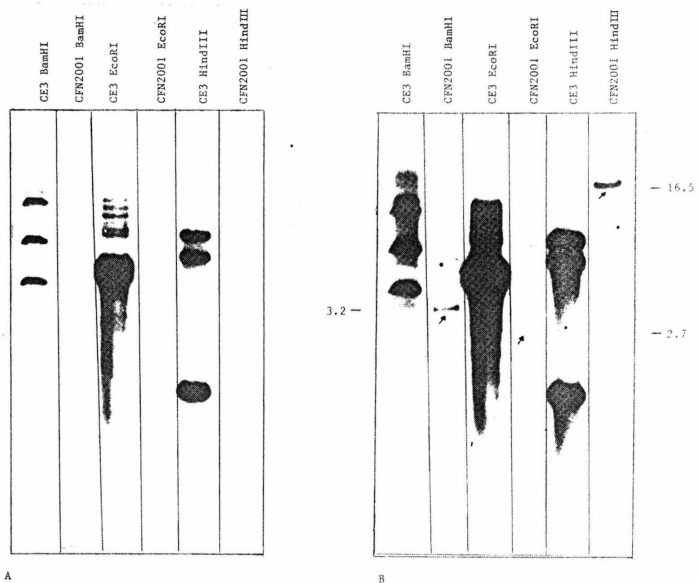


FIG 3 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifH* DE DNA TOTAL DE LAS CEPAS CE3 Y CFN2001 DIGERIDOS CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICION.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30X 42°C.

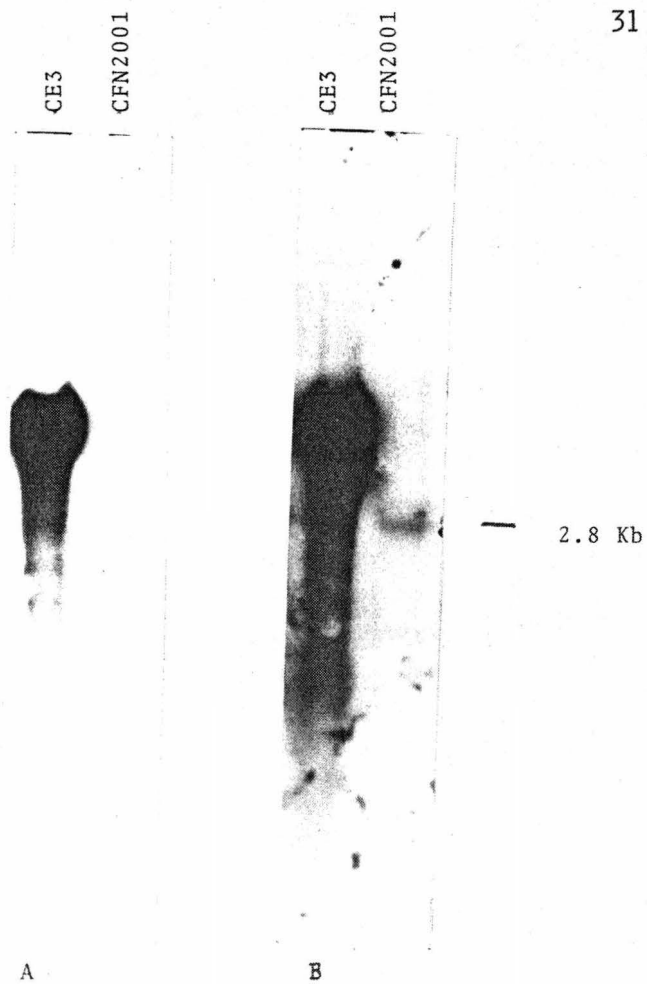


FIG 4 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifH* (600pb) DE DNA TOTAL DE LAS CEPAS CE3 Y CFN 2001 DIGERIDOS CON *EcoRI*.

A.- Mediana severidad, formamida 50%
B.- Baja severidad, formamida 25%

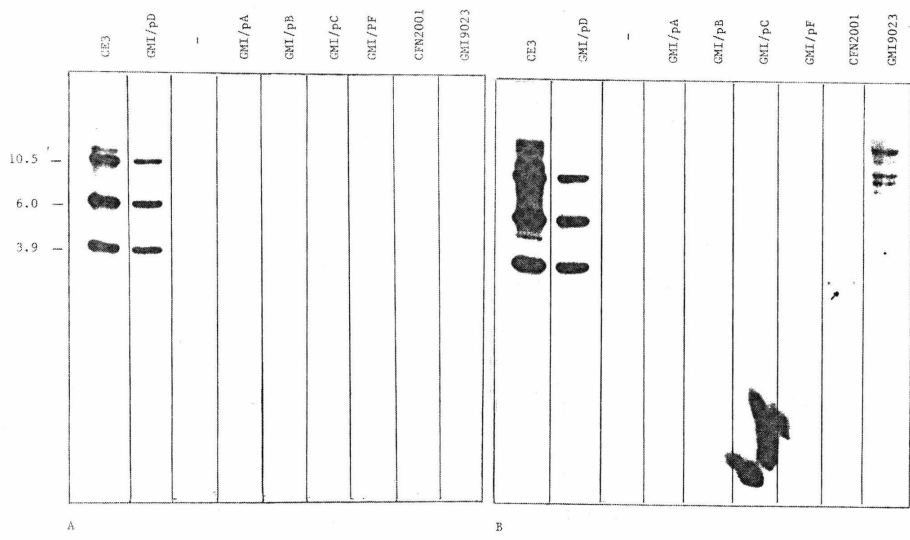


FIG 5 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifH* (intra-p15B) DE DNA TOTAL DE DIFERENTES CEPAS DE *R. phaseoli* y *A. tumefaciens* DICERIDOS CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Bam*HI.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30% 42°C.

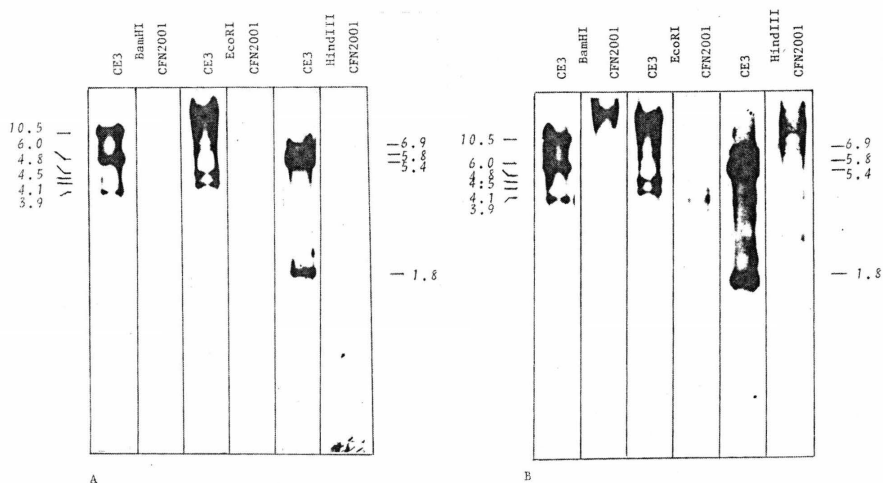


FIG 6 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifD* (P12D) DE DNA TOTAL DE LAS CEPAS CE3 y CFN2001 DIGERIDOS CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCION.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30% 42°C.

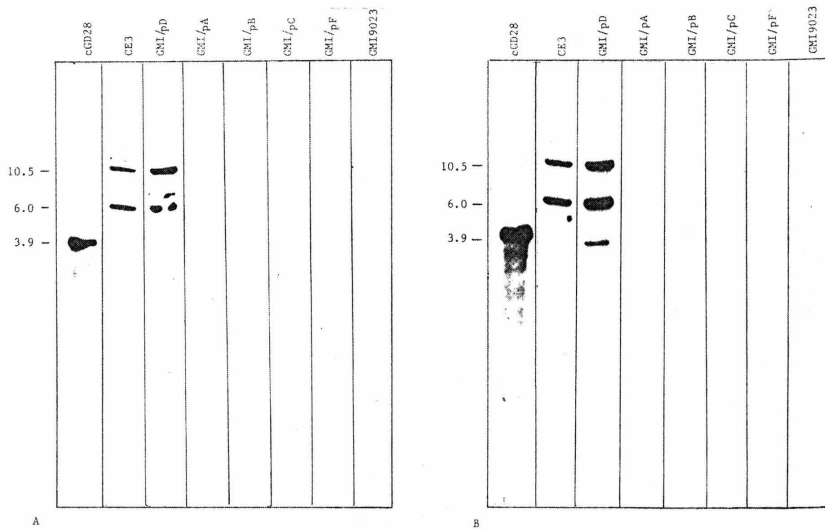


FIG 7 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifD* (p12D) DE DNA TOTAL DE DIFERENTES CEPAS DE *R. phaseolii* y *A. tumefaciens* DIGERIDOS CON LA ENZIMA *Bam*HI.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30% 42°C.

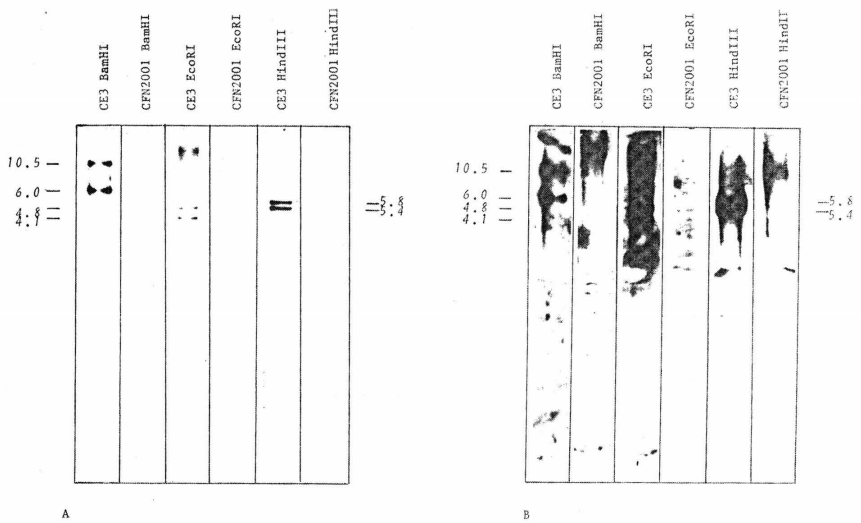


FIG 8 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifK* DE DNA TOTAL DE LAS CEPAS CE3 CFN2001 DIGERIDOS CON DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30% 42°C.

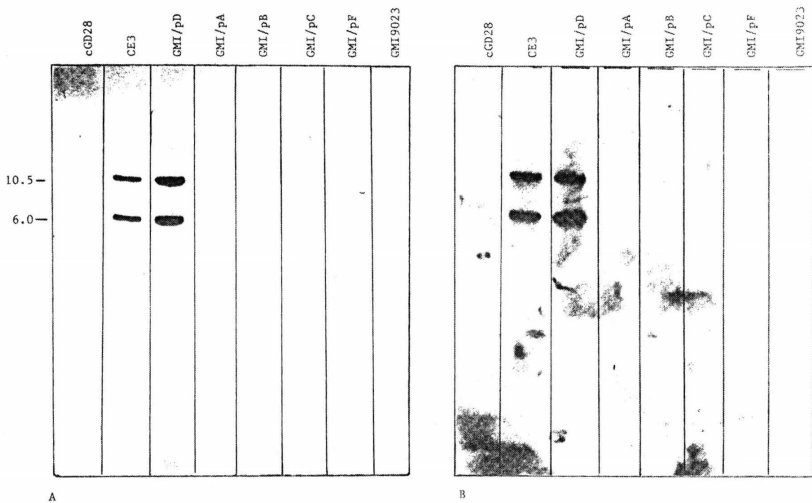


FIG 9 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA *nifK* (p12K) DE DNA TOTAL DE DIFERENTES CEPAS DE *R. phaseoli* y *A. tumefaciens* DIGERIDOS CON LA ENZIMA BamHI.

A.- Alta severidad, fosfatos 65°C.
 B.- Baja severidad, formamida 30% 42°C.

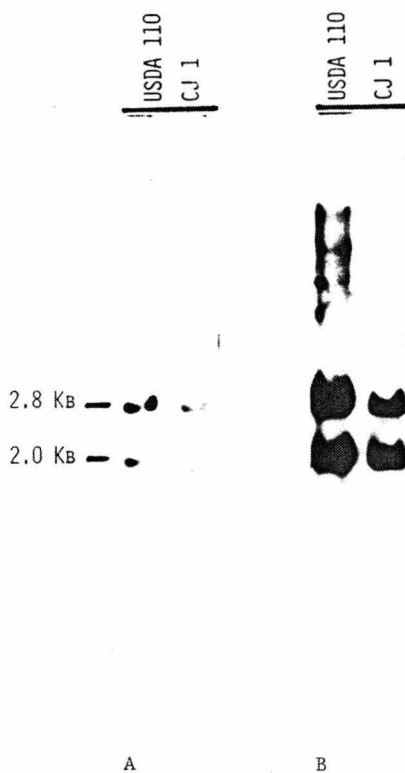


FIG 10 -- HIBRIDIZACION CONTRA UN DETECTOR ESPECIFICO PARA NifH DE DNA DE DIFERENTES CEPAS DE B. japonicum DIGERIDO CON LA ENZIMA DE RESTRICCION EcoRI.

A.- Mediana severidad, 50% formamida 42°C.

B.- Baja severidad, 25% formamida 42°C.

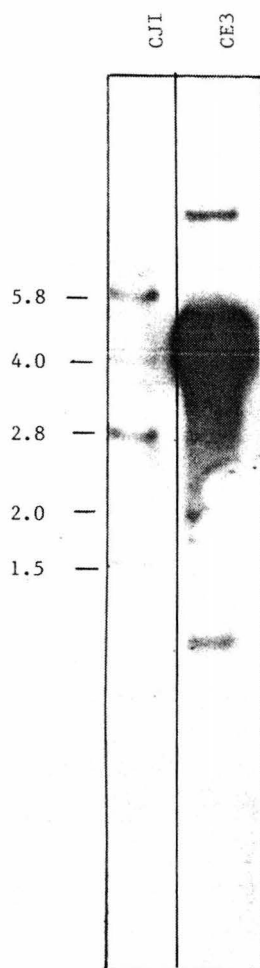
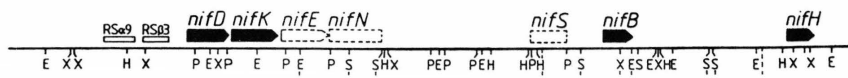


FIG 11 -- HIBRIDIZACION CONTRA EL PLASMIDO pCQ12 DE DNA DE LAS CEPAS CE3 Y CJI DIGERIDO CON LA ENZIMA DE RESTRICION EcoRI.

Baja severidad, formamida 25% 42°C.

FIG. 12 -- MAPA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DEL GRUPO DE GENES *nif*
 DE LA CEPA DE *B. japonicum* USDA110.



1kb

TOMADO DE EBELING ET AL, 1987.

TABLA 1 -- PRODUCTOS DE LOS GENES nif Y SUS FUNCIONES

GEN	P.M. PEPTIDO	FUNCION PROPUESTA
Q	--	Aparentemente involucrado en procesamiento de Mo.
B	60 K	Síntesis de FeMoco.
A	57-66 K	Activador <u>nif</u> específico.
L	50 K	Media la represión de los genes <u>nif</u> por O ₂ y por aminoácidos.
R, .W	--	Aparentemente no codifican para proteínas.
F	10-26 K	Flavodoxina.
M	27-28 K	Procesamiento de la proteína Fe.
V	24-38 K	Codifica para la homocitrato sintasa.
S	42-45 K	Maduración del centro MoFe
U	22-28 K	Posible combinación con el producto de <u>nifS</u> .
X	18 K	Posible papel en la síntesis de FeMoco.
N	50 K	Síntesis de FeMoco.
E	40-46 K	Síntesis de FeMoco.
Y	19-24 K	Posible papel en la maduración de la proteína MoFe.
K	60 K	Subunidad de la proteína MoFe.
D	56 K	Subunidad de la proteína MoFe.
H	34-35 K	Subunidad de la proteína Fe
C	13 K	Posible papel en la síntesis de FeMoco.
J	120 K	Codifica para una piruvato: flavodoxina oxido reductasa

Tomado de: Orme-Johnson, 1985

TABLA 2. PORCENTAJES DE CORRELACION DE SECUENCIAS CALCULADOS PARA nifH PARA DIFERENTES BACTERIAS.

Basados en secuencia de nucleótidos:

	Mcv	Mbi	Cpl	Cp2	Av	Ac	Kp	An	Rj	RP	Rs	Rm	Rt	Rp
Mct	59	53	55	57	46	41	37	49	41	40	40	42	47	47
Mcv		58	57	58	51	48	49	51	50	48	44	48	47	49
Mbi			58	57	46	47	47	47	43	44	43	39	45	44
Cpl				90	57	52	54	58	53	53	51	51	52	50
Cp2					57	52	55	57	55	53	50	27	51	49
Av						88	78	68	72	72	72	70	69	72
Ac							80	67	70	71	72	72	70	74
Kp								65	70	71	72	67	68	70
An									63	61	63	63	62	64
Rj										88	78	70	70	72
RP											80	73	70	75
Rs												72	71	74
Rm													80	84
Rt														81

Basados en secuencia de aminoácidos:

	Mcv	Mbi	Cpl	Cp2	Av	Ac	Kp	An	Rj	RP	Rs	Rm	Rt	Rp
Mct	55	50	50	51	48	47	48	46	46	46	45	48	46	48
Mcv		50	52	54	50	50	51	50	49	49	49	49	49	49
Mbi			53	54	50	51	48	46	48	48	48	47	50	48
Cpl				92	66	65	64	61	61	61	61	62	61	62
Cp2					66	65	65	61	61	63	61	63	63	63
Av						89	88	71	75	74	73	68	69	70
Ac							85	72	74	71	71	71	73	73
Kp								70	74	74	75	67	68	70
An									70	70	72	69	70	71
Rj										97	92	77	78	79
RP											93	76	77	79
Rs	ly2											79	77	80
Rm													91	93
Rt														90

Organismos: *Methanobacterium ivanovii* (Mbi), *Methanococcus thermolithotrophicus* (Mct), *Methanococcus voltae* (Mcv), *C. pasterurarium* (Cp), *A. vinelandii* (Av), *A. chroococcum* (Ac), *K. pneumoniae* (Kp), *Anabaena* (An), *B. japonicum* (Bj), *R. spp. Parasponia* (RP), *Rhizobium* ORS571 (Rs), *R. meliloti* (Rm), *R. trifolii* (Rt), *R. phaseoli* (Rp).

Tomado de: Souillard N, Magot M, Possot O & Sibold L. 1988.

TABLA 3. COEFICIENTE BINARIO DE CORRELACION (S_{AB}^{nif}) CALCULADO PARA LAS SECUENCIAS DE DNA Y PROTEINAS DE DIFERENTES BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO.

Gen	Especie	S_{AB}^{nif} con															
		RP		RC		Rm		Rt		Kp		An		Av		Cp	
		ns	as	ns	as	ns	as	ns	as	ns	as	ns	as	ns	as	ns	as
<u>nifH</u>	Bj	0.88	0.97	-	-	0.70	0.77	0.70	0.78	0.70	0.74	0.63	0.70	-	0.75	-	0.61
	RP	-	-	0.73	0.76	0.70	0.77	0.71	0.74	0.61	0.70	-	0.74	-	0.74	-	0.61
	Rm	-	-	-	-	0.80	0.91	0.67	0.67	0.63	0.69	-	0.68	-	0.68	-	0.61
	Rt	-	-	-	-	-	-	0.68	0.68	0.62	0.69	-	0.69	-	0.69	-	0.62
	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	0.65	0.70	-	0.88	-	0.88	-	0.69
	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.71	-	0.60
	Av	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.68
<u>nifD</u>	Bj	nd	0.93	nd	0.92	-	-	-	-	nd	0.66	nd	0.65	-	-	-	0.40
	RP	-	-	nd	0.94	-	-	-	-	nd	0.68	bd	0.64	-	-	-	0.40
	RC	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	0.69	nd	0.67	-	-	-	0.42
	Kp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	0.64	-	-	-	0.44
	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38
<u>nifK</u>	Bj	nd	0.89	-	-	-	-	-	-	-	nd	0.63	-	-	-	-	0.45
	RP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	0.60	-	-	-	-	0.42
	An	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.46

Abreviaciones y símbolos: ns, cálculos basados en la secuencia de nucleótidos; as, cálculos basados en la secuencia de aminoácidos; nd, cálculo no realizado; - secuencias no disponibles para comparación. Organismos: Bradyrhizobium japonicum (Bj), Rhizobium spp. Paraponia (RP), Rhizobium spp. Cowpea (RC), Rhizobium meliloti (Rm), Rhizobium trifolii (Rt), Klebsiella pneumoniae (Kp), Anabaena sp. 7120 (An), Azotobacter vinelandii (Av), Clostridium pasteurianum (Cp).

$$S_{AB}^{nif} = \frac{2 \times \text{num. de nucleótidos en posiciones idénticas en A y B}}{(\text{num. total de nucleótidos en A}) + (\text{num. total de nucleótidos en B})}$$

Tomado de: Henneke H, Kaluza K, Thöny B, Fuhrmann M, Ludwig W & Stackerbrandt E. 1985.

TABLA 4. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS

R. phaseoli

CE3
CFN2001

Noel et al, 1984

A. tumefaciens

GMI9023
GMI/pA CE3
GMI/pB CE3
GMI/pC CE3
GMI/pD CE3
GMI/pF CE3

Rosenberg et al, 1984
Flores et al, 1987
Flores et al, 1987
Flores et al, 1987
Flores et al, 1987
Flores et al, 1987

E. coli

HB101
MC1061

Maniatis et al, 1982
Casadaban et al, 1980

Plásmidos

pCQ12
p15B
p12D
p12K
pBR329
cGD28

Quinto et al, 1985
Lab. del Dr. Palacios
Este trabajo
Este trabajo
Covarrubias et al, 1982
Dávila et al, 1988

B. japonicum

USDA110
CJ1

Colección NifTal
O'Gara et al, 1984

REFERENCIAS

- Agarwal AK & Keister DL. 1983 Physiology of ex planta nitrogenase activity in R. japonicum. Appl. and environ. microbiol. 45:1592-1601.
- Ausubel FM & Cannon FC. 1982. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. XLV:487-499.
- Bali A, Hill S, Santero E, Toukdarian AJ, Walmsley J & Kennedy C. 1988. NifA and NtrC separate nitrogen fixation pathways in Azotobacter. In:Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, p 316.
- Bishop PE, Jarlenski DM & Hetherington DR. 1980. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in A. vinelandii. PNAS. 77:7342-7346.
- Bishop PE, Premakumar R, Joerger RD, Jacobson MR, Dalton DA, Chisnell JR and Wolfinger ED. 1988. Alternative nitrogen fixation systems in A. vinelandii. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 71-79.
- Birnboim H & Doly L. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Ac. Res. 7:1513-1523.
- Bravo A & Mora J. 1988a. Ammonium assimilation in R. phaseoli by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. J. Bacteriol. 170:980-984.
- Bravo A, Becerril B & Mora J. 1988b. Introduction of E. coli gdhA gene into R. phaseoli: effect on nitrogen fixation. J. Bacteriol. 170: 985-988.
- Bravo A, Martínez LM, Calderón J & Mora J. 1989. Isolation and characterization of a tn-5 induced mutant of R. phaseoli affected in the GSII activity and nitrogen fixation . Sometido a publicación.
- Buikema W, Klingensmith JA, Gibbons SA & Ausubel FM. 1987. Conservation of structure and location of R. meliloti and K. pneumoniae nifB genes. J. Bacteriol. 169: 1120-1126.
- Burris RH. 1988. 100 hundred years of discoveries in biological nitrogen fixation. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 21-30.
- Casadaban MJ & Cohen SN. 1980. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in E. coli. J. Mol. Biol. 138:179-207.
- Chen KC, Chen J & Johnson JL. 1986. Structural features of mul-

tiple nifH-like sequences and very biased codon usage in nitrogenase genes of Clostridium pasteurianum. J. Bact. 166:162-172.

-Chisnell JR, Premakumar R & Bishop PE. 1988. Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain in A. vinelandii. J. Bacteriol. 170:22-33.

-Covarrubias L & Bolivar F. 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. Gene. 17:79-89.

-Dávila G, Brom S, Flores M, Girard ML, González V, Louzada M, Martínez J, Martínez E, Palacios R, Piñero D, Romero D & Valdez AM. 1988. The symbiotic genome of R. phaseoli. In: Palacios R, Verma DP (eds) Molecular genetics of plant-microbe interactions. APS Press. USA. pp 187-191.

-Defrancesco N & Potts M. 1988. Cloning of nifHD from Nostoc commune UTEX584 and of a flanking region homologous to part of the A. vinelandii nifU gene. J. Bact. 170:3297-3300.

-Deistung J, Cannon FC, Cannon MC, Hill S & Thorneley RNF. 1985. Electron transfer to nitrogenase in K. pneumoniae: nifF gene cloned and the gene product, a flavodoxin, purified. Biochem. J. 231:743-754.

-Eady RR, Robson RL, Richardson TH, Miller RW & Hawkins M. 1987. The vanadium nitrogenase of A. chroococcum: purification and properties of the V-Fe protein. Biochem. J. 244:197-207.

-Eady RR, Robson RL, Pau RN, Wodley P, Lowe PJ, Miller RW, Thorneley RNF, Smith BE, Gormal C, Fisher K, Eldridge M & Bergstrom J. 1988. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 81-86.

-Ebeling S, Hahan M, Fischer HM & Hennecke H. 1987. Identification of nifE-, nifN- and nifS-like genes in B. japonicum. Mol. Gen. Genet. 207:503-508.

-Filler WA, Kemp RM, Ng JC, Hawkes TR, Dixon RA & Smith BA. 1986. The nifH gene product is required for the synthesis or stability of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from K. pneumoniae. Eur. J. Biochem. 160:3710378.

-Flores M, González V, Brom S, Martínez E, Piñero D, Romero D, Dávila G & Palacios R. 1987. Reiterated DNA sequences in Rhizobium and Agrobacterium spp. J. Bacteriol. 169:5782-5788.

-Gebhardt C, Turner GL, Gibson AH, Dreyfus BL & Bergersen FJ. 1984. Nitrogen-fixing growth in continuous culture of a strain of Rhizobium sp. isolated from stem nodules on Sesbania rostrata.

J. Gen. Genet. 130:843-848.

-Hahn M & Hennecke H. 1984. Localized mutagenesis in Rhizobium japonicum. Mol. Gen. Genet. 193:46-52.

-Hearst JE, Alberti M & Doolittle RF. 1985. A putative nitrogenase reductase gene found in the nucleotide sequences from the photosynthetic gene cluster of R. capsulata. Cell. 40:219-220.

-Hennecke H. 1981. Recombinant plasmids carrying nitrogen fixation genes from R. japonicum. Nature. 291:354-355.

-Hennecke H, Kaluza K, Thony B, Fuhrmann M, Ludwig W & Stackebrandt E. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in Rhizobium species and other nitrogen fixing bacteria. Arch. Microbiol. 142:342-348.

-Jacobson MR, Premakumar R & Bishop PE. 1986. Transcriptional regulation of nitrogen fixation by A. vinelandii. J. Bacteriol. 167:480-486.

-Joerger RD, Premakumar R & Bishop PE. 1986. tn-5 induced mutants of A. vinelandii affected in nitrogen fixation under Mo-sufficient conditions. J. Bacteriol. 168:673-682.

-Joerger RD & Bishop PE. 1988. Bacterial alternative nitrogen fixation systems. CRC Crit. Rev. in Microbiol. 16:1-14.

-Jones R, Woodley P & Robson R. 1984. Cloning and organization of some genes for nitrogen fixation from A. Chroococcum and their expression in K. pneumoniae. Mol. Gen. Genet. 197:318-327.

-Kaminski PA, Desnoues N, Norel F, Kush A & Elmerich C. 1988. Nitrogen fixation genes in A. caulinodans ORS571: characterization of the nifH2 - fixABC region. In:Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, p. 374.

-Keister DL. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of Rhizobia. J. Bacteriol. 123:1265-1268.

-Kennedy C, Gamal R, Humphrey R, Ramos J, Brigle K & Dean D. 1986. The nifH, nifM and nifN genes of Azotobacter vinelandii: characterization by tn-5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. Mol. Gen. Genet. 295:318-325.

-Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

-Martínez E, Pardo MA, Palacios R & Cevallos MA. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. of Gen. Microbiol. 131:1779-1786.

-Merrick MJ. 1988. Organisation and regulation of nitrogen fixation genes in Klebsiella and Azotobacter. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 293-302.

-Mora J, Bravo A, Calderón J, Encarnación S, Hernandez G, Martínez LM, Narvez V, Rodríguez O, Taboada H & Terrones D. 1988a. Ex-planta nitrogen metabolism in R. phaseoli. In: Palacios R & Verma DPS. Molecular genetics of plant-microbe interactions, APS Press, USA. p. 130.

-Mora J, Calderón J & Hernández G. 1988b. Search, assimilation and turnover of nitrogen in some fungi. In: Sánchez-Esquivel S (Ed) Nitrogen source control of microbial processes. CRC press, USA. pp 59-81.

-Morett E, Moreno S & Espín G. 1988. Transcription analysis of the three nifH genes of R. phaseoli with gene fusions. Mol. Gen. Genet. 213:499-504.

-Noel KD, Sánchez A, Fernández L, Leemans J & Cevallos MA. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposons tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148-155.

-Norel F, Desnoves N & Elmerich C. 1985. Characterization of DNA sequences homologous to K. pneumoniae nifH, D, K and E in the tropical Rhizobium ORS571. Mol. Gen. Genet. 199:352-356.

-Norel F & Elmerich C. 1987. Nucleotide sequence and functional analysis of the two nifH copies of Rhizobium ORS571. J. Gen. Microbiol. 133:1563-1576.

-O'Gara F, Manian S & Meade J. 1984. Isolation of asm⁻ mutant of R. japonicum defective in symbiotic nitrogen fixation. FEMS Microbiol. Lett. 24:241-245.

-Orme-Johnson WH, 1985. Molecular basis of biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Biophys. Chem. 14:419-459.

-Pawloski K, Ratet P, Schell J & de Bruijn F. 1987. Cloning and characterization of nifA and ntrC genes of the stem nodulating bacterium ORS571, the nitrogen fixing symbiont of Sesbania rostrata: regulation of nitrogen fixation (nif) genes in the free living versus symbiotic state. Mol. Gen. Genet. 206:207-219.

-Postgate J. 1981. Fijación del nitrógeno. Editorial Omega, Barcelona. p15.

-Quinto C, de la Vega H, Flores M, Fernández L, Ballado T, Soberón G & Palacios R. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in R. phaseoli. Nature 299:724-725.

-Quinto C, de la Vega H, Flores M, Leemans J, Cevallos MA, Pardo

- MA, Azpiroz R, Girard MdeL, Calva E & Palacios R. 1985. Nitrogenase reductase: a multigene family in R. phaseoli. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 82:1170-1174.
- Reidel GE, Ausubel FM & Cannon FC 1979. Physical map of chromosomal nitrogen fixation nif genes of K. pneumoniae. PNAS 76:2866-2870.
- Rigby PWJ, Dieckman M, Rhodes C & Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to a high specific activity in vitro by nick-translation with DNA-polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237-251.
- Robinson AC. 1987. J. Biol. Chem. 262:14327-14332.
- Robson RL. 1986. Nitrogen fixation in strains of A. chroococcum bearing deletions of a cluster of genes coding for nitrogenase. Arch. Microbiol. 146: 74-79.
- Robson RL, Woodley PR & Jones R. 1986. Second gene (nifH*) coding for a nitrogenase-iron protein in A. chroococcum is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. EMBO J. 5:1159-1163.
- Robson RL, Eady RR, Richardson TH, Miller RW, Hawkins M & Postage JR. 1986. The alternative nitrogenase from A. vinelandii is a vanadium enzyme. Nature 322:388-390.
- Robson RL, Woodley P, Pau R & Eady RR. 1988. Cloning and analysis of the structural genes (vnfD, vnfG and vnfK) for the VFe-protein of the V-nitrogenase from A. chroococcum. 1988. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 323.
- Romero D, Singleton PW, Segovia L, Morett E, Bohlool BB, Palacios R & Dávila G. 1988. Effect of naturally occurring nif reiterations on symbiotic effectiveness in R. phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 54:848-850.
- Rosenberg C & Hugnet T. 1984. The pAtC58 of A. tumefaciens is not essential for tumor induction. Mol. Gen. Genet. 196:533-536.
- Ruvkun GB & Ausubel FM. 1980. Interspecies homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:191-195.
- Santero E. (1988) Mol. Microbiol. En prensa.
- Schumann JP, Waitches GM & Scolnik PA. 1986. A DNA fragment hybridizing to a nif probe in R. capsulatus is homologous to a 16S rRNA gene. Gene. 48:81-92.
- Scolnik PA & Haselkorn R. 1984. Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in Rhodospseudomonas capsulata. Nature. 307:289-292.

-Smith BE, Buck M, Eady RR, Lowe DJ, Thorneley RNF, Ashby G, Deistung J, Eldrige M, Fisher K, Gormal C, Ioannidis I, Kent H, Arber J, Flood A, Garner CD, Hasnain S & Miller R. 1988. Recent studies on the structure and function of molybdenum nitrogenase. In: Bothe H, de Bruijn FJ, Newton WE (eds). Nitrogen Fixation: Hundred years after. Gustav Fischer, Stuttgart, pp 91-100.

-Somasegaran P & Hoben HJ. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. Niftal, USA.

-Souillard N & Sibold L. 1986. Primary structure and expression of a gene homologous to nifH (nitrogenase Fe protein) from the archaeobacterium Methanococcus voltae. Mol. Gen. Genet. 203:21-28.

-Souillard N, Magot M, Possot O & Sibold L. 1988. Nucleotide sequences of regions homologous to nifH (nitrogenase Fe protein) from the nitrogen-fixing archaeobacteria Methanococcus thermoautotrophicus and Methanobacterium ivanovii: evolutionary implications. J. Mol. Evol. 26:

-Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-518.

-Toukdarian A & Kennedy C. 1986. Regulation of nitrogen metabolism in A. vinelandii isolation of ntr and glnA genes and construction of Ntr mutants. EMBO J. 5:399-407.