

13
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DE LA EXPRESION DEL ACTIVADOR
TRANSCRIPCIONAL NifA EN
Bradyrhizobium japonicum

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

HUMBERTO BARRIOS CAMACHO



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante Humberto
Barrios Camacho
con número de cuenta 8501079-8 con el título: Regulación de la expresión del activador transcripcional
NifA en Bradyrhizobium japonicum.

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Biólogo.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

Dr. Juan Enrique Morett Sanchez

Director de Tesis Victor Manuel Valdés López

Biólogo Carlos Alberto Castillo Pompello

Dr. en C. René de Jesús Cárdenas Vazquez

Suplente Gisele Olivia Rosas Solares

Suplente

**A la memoria de mis abuelos:
Conrado Barrios y Felix Delgado**

**A mi Padre: por la sabiduría que existe en sus
palabras**

**A mi Madre: por su comprensión y confianza
que siempre sentí cerca de mí**

A Samantha por todo

AGRADECIMIENTOS

Hay personas importantes que sin su apoyo hubiera sido imposible la realización de este trabajo. Quiero dar mi más profundo agradecimiento a:

Enrique, porque me brindó su confianza y su apoyo e invirtió su invaluable tiempo en este proceso que es mi formación académica, además de darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo.

Mis hermanos: Edgar, Arturo, Victor Hugo, Edith, Abraham y Aarón porque su libertad de pensamiento y convivencia fueron de gran ayuda en mi vida personal.

Mi Tia Sonia, por su ayuda desinteresada que me dió durante los momentos mas difíciles de mi vida.

A los amigos de la alcoholescencia en la Facultad de Ciencias, Los Perros, por las mil y una aventuras y experiencias que pasamos juntos.

Lety, Araceli y Brenda, por su ayuda y amistad de siempre.

Sonia, por ser mi mejor amiga en esta parte de mi vida.

Elsa y Carolina, por esa amistad incondicional.

A mis compañeros del laboratorio por hacerme alegre la vida en el trabajo.

**Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Sobre Fijación
de Nitrógeno (UNAM), Cuernavaca, Morelos, bajo la asesoría del
Dr. J. Enrique Morett S.**

RESUMEN

Durante algunos años se ha estado caracterizando al operón *fixRnifA* de *B. japonicum*, por encontrarse codificado el activador transcripcional NifA dentro de éste. Esta proteína reguladora es elemental dentro de la fijación de nitrógeno en *B. japonicum* y en muchas otras bacterias por su capacidad de activar positivamente la transcripción de los genes *nif* y *fix*. Trabajos previos de Morett, *et al.* (1993) han sugerido la existencia de un doble inicio de transcripción para el operón *fixRnifA*. Esto llevó a proponer la existencia de un doble sistema de regulación donde uno de los sistemas es expresado por una proteína activadora y una σ^7 RNA-polimerasa diferentes de NifA y σ^{54} RNA-polimerasa.

En este trabajo probamos la existencia de un doble sistema de regulación para la activación de la expresión transcripcional de NifA que es el regulador central dentro de la fijación de nitrógeno. Uno de los sistemas caracterizados es el dependiente de NifA y σ^{54} , este se expresa exclusivamente en condiciones de anaerobiosis 5 veces más que el otro sistema. El otro sistema, denominado NifA independiente, se expresa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y está regulado por otra proteína activadora distinta de NifA que muy posiblemente se regula por oxígeno. Este segundo regulador requiere de la región -66 para su expresión, y utiliza un factor σ^7 distinto de σ^{54} . Los sitios de inicio de la transcripción para estos dos sistemas están separados solamente por dos nucleótidos.

Por lo tanto, en la expresión del operon *fixRnifA* se encuentran involucrados dos sistemas de regulación que se encuentran solapados sobre la misma región promotora. Dentro de bacterias fijadoras de nitrógeno no se han reportado sistemas tan finamente regulados y complejos como el estudiado en éste trabajo.

FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es el principal elemento en la atmósfera donde se encuentra en forma diatómica (N_2), y uno de los principales en la corteza terrestre. Es, además, uno de los elementos más abundantes que conforman a la gran mayoría de las moléculas en los seres vivos, formando parte de los aminoácidos, cofactores enzimáticos, ácidos nucleicos, etc.

Uno de los procesos para la obtención de nitrógeno asimilable para los organismos ésta dado por la fijación biológica del nitrógeno, que es un proceso de reducción enzimática del N_2 atmosférico a amonio por medio de la enzima nitrogenasa (31). Este proceso es energéticamente muy costoso, utilizando mas de 16 moles de ATP por mol de N_2 transformado en amonio. Por esta razón, los niveles de regulación a los que están sujetos todos los genes involucrados en la fijación de nitrógeno tienen que ser bastante finos para evitar un consumo de energía excesivo.

El proceso para fijar nitrógeno se da en una gran diversidad de organismos procarlotes, incluyendo bacterias fotosintéticas, algunas algas verde-azules, actinomicetos, organismos aerobios obligados, anaerobios facultativos y obligados. Dentro de estos se encuentran los organismos de vida libre así como las bacterias que viven en simbiosis, como es el caso de algunas Rhizobiaceae, dentro de las cuales se encuentra *Bradyrhizobium japonicum*, simbiote de la soya (*Glycine max.*), la cual se utilizó para realizar este trabajo (30).

Klebsiella pneumoniae Y SU GENETICA

Uno de los primeros organismos en los que se estudió genéticamente la fijación de nitrógeno es *Klebsiella pneumoniae*. La fijación de nitrógeno requiere de la expresión de varios genes que se denotan como *nif*. La denominación de genes *nif* se propuso al encontrar por primera vez algunos genes involucrados en la fijación de nitrógeno en *K. pneumoniae* y de secuenciar posteriormente un grupo de 19 genes continuos que se encuentran involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno.

Los genes homólogos de otros organismos con los genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, son también denominados como *nif*. La existencia de otros genes involucrados en la fijación de nitrógeno, que no presentan homología con los ya conocidos *nif* son denominados como *fix*.

La expresión de los genes *nif* dan la capacidad de fijar nitrógeno tanto a los organismos de vida libre como simbióticos, mutantes en estos últimos genes presentan fenotipos de formación de nódulos pero incapaces de fijar nitrógeno.

Los genes *nif*, por otra parte, son responsables de la síntesis y funcionalidad del complejo enzimático de la nitrogenasa que reduce el N_2 en amonio (2). Esta nitrogenasa está formada por dos componentes. El componente 2 (también llamada Fe proteína o dinitrogenasa reductasa), esta codificado por los genes *nifH*. Este es un dímero de dos subunidades idénticas, su función es la de donar electrones al componente 1, el cual los utiliza para reducir el N_2 a NH_3 . El componente 1 (también llamado MoFe proteína o dinitrogenasa), es un tetrámero de dos subunidades α que son codificadas por los genes *nifD* y la subunidad β codificada por *nifK*. El ensamblaje de esta enzima se encuentra mediado por el producto de varios genes *nif* y la funcionalidad de este complejo es elemental para la fijación de nitrógeno.

Promotores sigma 54: La existencia de diferentes factores sigma dan especificidad a la RNA-polimerasa, que se encuentra conformada por las subunidades α 2, β y β' , para interactuar con los promotores y formar el complejo cerrado de RNAPol- σ (E σ)-promotor, para posteriormente iniciar la transcripción.

Existen varios tipos de factores sigma: los primarios que se expresan constitutivamente, como es el caso de σ^{70} (σ primario de *E. coli*) que está relacionado con la expresión de funciones vitales de sobrevivencia, y los sigma alternativos como σ^{32} , σ^A , σ^B , σ^{54} , etc. que se expresan para activar a determinados genes, los cuales desempeñan funciones específicas. Dentro de estos sigma alternativos se encuentra σ^{54} que es esencial para la activación transcripcional de los genes *nif* en *Klebsiella pneumoniae* y otros organismos fijadores de nitrógeno.

Los factores sigma se pueden dividir en dos grupos: los factores que en su secuencias de proteína se relacionan con la familia de σ^{70} y el factor σ^{54} (codificados por el gene *ntrA* o *rpoN*)(28). Los promotores reconocidos por el factor σ^{54} presentan una región consenso CTGGCAC -N5 -TTGCA (-24 /-12), upstream del sitio de inicio de transcripción, este consenso se encuentra en la mayoría de los genes *nif* y *fix* (4,33). Estos promotores sigma 54 tienen una clara diferencia con los correspondientes a σ^{70} que presentan el consenso TTGACA N17 TATACA (-35 / -10) en la región upstream del inicio de transcripción, que son los más comunes en bacterias y dentro de los cuales se encuentran la mayoría de los sigma alternativos (28).

Los promotores para sigma 54, no son exclusivos para la fijación de nitrógeno y se han encontrado en una gran variedad de genes con funciones muy variadas como es el caso de *melA* en *R. leguminosarum* que se requiere para la síntesis del pigmento de melanina o como *groES4* en *Bradyrhizobium japonicum* que codifica para la síntesis de una chaperonina involucrada en el crecimiento (6,25).

Estructuralmente, la proteína sigma 54 presenta un HTH (Helice-Vuelta-Helice) en su dominio carboxilo terminal, el cual está involucrado en el reconocimiento de la región -24 del promotor. Se ha propuesto que el reconocimiento de la región -12, está dada por dos cierres de leucina, encontrándose uno en el amino-terminal y otro en el carboxilo-terminal de la proteína. En el dominio central, se presenta una región ácida que probablemente está involucrada en la apertura de la doble cadena de DNA, quizás interactuando con la proteína activadora (28).

Activador transcripcional NifA: Uno de los activadores transcripcionales mas ampliamente distribuido entre los organismos fijadores de nitrógeno, es la proteína NifA, que es un regulador positivo de la transcripción y que activa a los promotores σ^{54} para isomerizar el complejo cerrado de RNAPol- σ a un complejo abierto e iniciar la transcripción. NifA se identificó inicialmente en *K. pneumoniae*. Esta proteína, que se encuentra presente en diferentes organismos, tiene una homología en secuencia nucleotídica que permitió definir 3 dominios funcionales, siendo el central el que mayor homología presenta.

Estructuralmente, NifA presenta un dominio amino-terminal, que en el caso de *K. pneumoniae*, regula la interacción con NifL. En el caso de los Rhizobia, este dominio no se requiere para la óptima actividad de NifA, como se ha visto al realizar deleciones completas en dicho dominio. Actualmente no se le ha atribuido una función específica (11). El dominio amino terminal se une al dominio central por un interdominio llamado Q-linker, que es rico en glutamina. La función que se le atribuye es la de unir a los dos dominios con los que limita. El dominio central presenta un grupo de 238 aminoácidos que se encuentran altamente conservados, siendo común para todas las proteínas activadoras de promotores σ^{54} . La gran similitud que presenta este dominio en los activadores de promotores -24/-12 sugiere que puede estar involucrado en la interacción con la RNA polimerasa- σ^{54} para iniciar la transcripción. Este dominio tiene una región con una secuencia que presenta una alta similitud con los sitios de unión de ATP en varias proteínas (21). Se ha visto en *R. meliloti* que el dominio central es suficiente para iniciar la transcripción de *nifH* (21,30).

La familia de NifA se ha dividido en dos grupos: las que son sensibles al oxígeno por sí mismas y las que no presentan esta sensibilidad como es el caso de NifA de *K. pneumoniae* y *A. vinelandii* (12). La sensibilidad al oxígeno se relaciona con la presencia o ausencia de un interdominio de 38 aminoácidos con 2 cisteínas separadas por 4 residuos aminoácidos entre el dominio central y el carboxilo terminal. Se ha propuesto que un ion metálico se une a estos dos residuos y que se oxida en presencia de O₂, dejando a la proteína inactiva (12).

El dominio carboxilo terminal presenta una secuencia que probablemente se estructura como el típico hélice-vuelta-hélice (HTH), constituyendo el dominio de la proteína que interacciona con el DNA. Por medio de experimentos de metilación *in vivo*, utilizando únicamente el dominio carboxilo-terminal de NifA, se ha visto que éste efectivamente se une a las UAS de *nifH* de *K. pneumoniae*, pero por sí solo, no tiene la capacidad de activar la transcripción (8,32).

Secuencias activadoras upstream (UAS): Para que se inicie la transcripción de la mayoría de los genes *nif* en *K. pneumoniae*, existen secuencias donde se unen las proteínas activadoras como NtrC y NifA en las regiones upstream de los promotores σ^{54} que sirven para activar positivamente la transcripción (8,32). Estas secuencias conservadas se denominan UAS y se localizan entre -100 y -200 pares de bases upstream del inicio de transcripción, siendo funcionales hasta a 2 kilobases (3). Estas secuencias deben de encontrarse en una orientación determinada en la hélice del DNA al igual que el promotor σ^{54} para poder ser funcional la interacción de las proteínas. Esto se dedujo al introducir deleciones de 5 y 15 pares de bases que alteraban la posición relativa de las UAS con respecto al promotor en la rotación de la doble cadena del DNA y reducían la actividad del promotor pero al introducir deleciones de 11 y 20 pares de bases no se vió una reducción tan grande en la actividad del promotor *nifH* de *K. pneumoniae* (30).

Las UAS para NifA presentan un consenso TGT N₁₀ ACA, que es elemental para la expresión de los promotores de los genes *nif* y *fix* en la mayoría de los casos, pero existe excepciones de promotores que no necesitan de las UAS y pueden iniciar la transcripción sólo con la interacción en trans de la proteína activadora y la RNA polimerasa (21,30).

Modelo de activación a distancias: Con el estudio de la genética de *K.pneumoniae*, se sabe ahora que los promotores σ^{54} dan especificidad para que se reconozcan los genes *nif* por la RNAPolimerasa- σ^{54} , además de que es necesaria la proteína activadora NifA y la presencia de UAS en las regiones upstream para que se inicie la activación de la transcripción. Pero existía la pregunta de como NifA si se unía en las UAS que se encuentran entre -100 y -200 bases upstream del inicio de transcripción tenían la capacidad de activar la transcripción.

Con estudios realizados en *K. pneumoniae* se propuso el modelo de activación a distancia por loop que ha permitido comprender de qué manera una proteína que se une a regiones upstream de promotores σ^{54} puede activar la transcripción a distancia (en cis) como los enhancer de eucariotes (20,26).

Un ejemplo bien estudiado de este sistema es el *nifH* de *K. pneumoniae*. Este gen presenta un promotor -24/-12, para σ^{54} (5). En su región upstream -70/-43 presenta un sitio de unión para el IHF (Integration Host Factor). El IHF es una proteína que se requiere para la infección del bacteriófago T4 en *E. coli*, donde se identificó por primera vez. Esta proteína tiene la capacidad de doblar el DNA y juega un papel importante en una gran variedad de procesos, incluyendo recombinación en sitios específicos, transposición, inicio de replicación de plásmidos y expresión de genes (20).

La unión del IHF en el promotor de *nifH* permite doblar el DNA, facilitando el acercamiento de NifA, unida a las UAS (-140/-125 pb. upstream) con el promotor, en donde se encuentra el complejo RNAPol- σ^{54} , y con el cual interactúa para isomerizar el complejo cerrado a uno abierto, por medio de la hidrólisis de ATP e iniciar la transcripción (27)(fig.1).

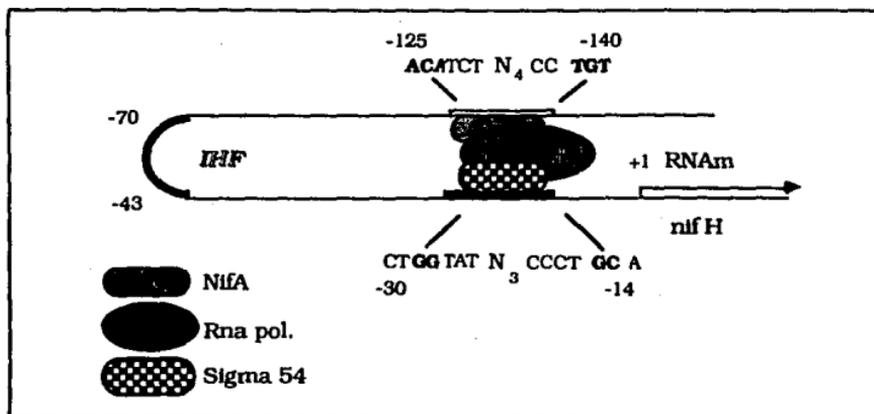


Fig. 1
Modelo de regulación por "loop" en *nifH* de *K.pneumoniae*

REGULACION GENETICA DE LA FIJACION DE NITROGENO

Entre los sistemas más conocidos de regulación genética de la fijación de nitrógeno se encuentran el de *K. pneumoniae* y *R. meliloti*.

K. pneumoniae. Esta bacteria es un organismo diazótrofo, en donde la regulación de los genes *nif* está sujeta a la disponibilidad de nitrógeno y a las condiciones de oxígeno en la célula; ambos afectan la expresión del activador transcripcional de los genes *nif* y *fix*, que es la proteína reguladora NifA. El gene que codifica para NifA se encuentra dentro del operón *nifLA*, el cual presenta un promotor sigma 54 típico.

La activación de la expresión del operón *nifLA*, en donde se encuentra codificada NifA, está regulada por la proteína activadora NtrC. La regulación de la actividad de esta última, se encuentra mediada por el contenido de nitrógeno dado por la relación de α -cetoglutarato y glutamina celular. En la regulación de NtrC se encuentran involucrados 4 elementos, siendo la Urasa (*glnD*), el sensor primario de los niveles de α -cetoglutarato/glutamina celular. Cuando esta relación es alta, esta proteína uridila a una pequeña proteína efectora (P-II) tetramérica codificada por *glnB*. Esta uridilación (PII - UMP) promueve la autofosforilación de NtrB que transfiere el grupo fosfato a NtrC y ésta última al ser fosforilada queda en su forma activa.

Cuando los niveles de glutamina aumentan, esta serie de eventos en cascada se dan de manera inversa, empezando con las desfosforilaciones y continuando con la desuridilación del producto de *glnB* (30).

A la vez, los niveles de oxígeno en la célula afectan la síntesis y la actividad de NifA. Las condiciones de anaerobiosis favorecen el grado de super enrollamiento de la región promotora del operón *nifLA* que permiten su expresión. Por otra parte el O₂ afecta la actividad de la proteína reguladora NifL, que se activa a concentraciones altas de oxígeno, formando un complejo proteína-proteína con NifA, inhibiendo a esta última, y por consiguiente, impidiendo la activación de los demás genes *nif* dependientes de NifA, además de que NifL también tiene la capacidad de sensar los niveles de nitrógeno e inactivar a NifA. (Fig.2)(30).

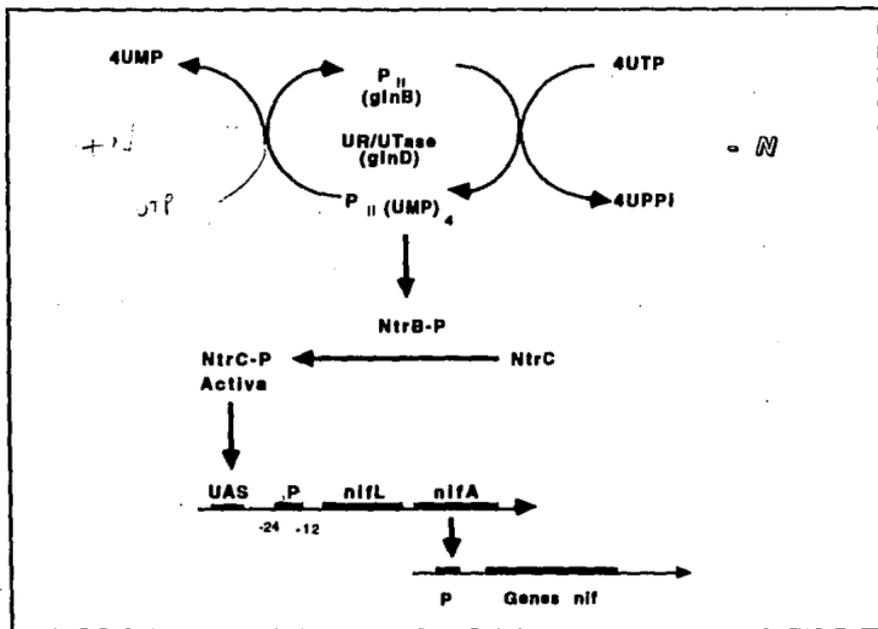


Fig. 2

Modelo de regulación de la expresión de los genes en *K.pneumoniae*

R. meliloti. En este organismo la regulación de la fijación de nitrógeno se ve mediada por las concentraciones de oxígeno, las cuales son censadas por FixL, que es una hemoproteína membranal, que al igual que NtrB de *K. pneumoniae* se autofosforila. Pero FixL fosforila a FixJ a bajos niveles de oxígeno que ya fosforilada interactúa con la RNA polimerasa para activar la transcripción de *nifA*, que a su vez permitirá la transcripción del resto de los genes *nif* y *fix* (19). FixJ también activa a FixK, que es otra proteína reguladora y que es responsable de otra cascada de regulación mediada por oxígeno (Fig.3).

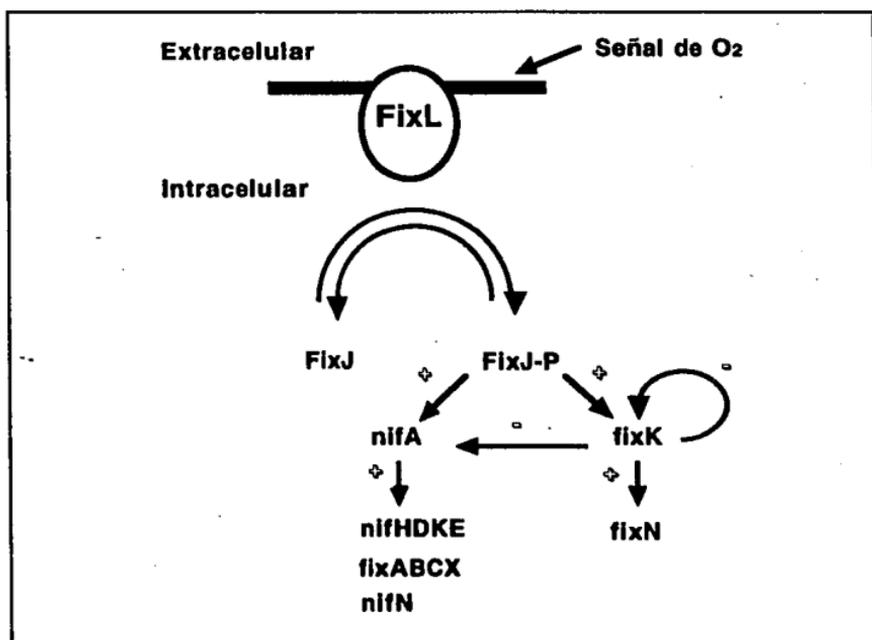


Fig. 3

Modelo de regulación de la expresión de los genes en *Rhizobium meliloti*

B. japonicum. El gene que codifica para *nifA*, presenta regulación por los niveles de oxígeno. NifA se encuentra dentro del operón *fixRnifA*, el cual presenta un promotor con el típico consenso de σ^{54} . Este operón se activa tanto aeróbicamente como anaeróbicamente. En esta última condición, NifA se autoactiva aumentando su transcripción y por ende, la de los demás genes dependientes de ella como *nif*, *fix* y otros (17). Los datos más recientes indican que, en condiciones aeróbicas, el operón responde quizás a una activación en trans por otra proteína reguladora diferente de NifA que aún no se ha identificado, pero se sabe de su unión en la región -81 /-50 upstream del sitio de inicio de transcripción. Esta activación es independiente de σ^{54} y NifA, presentando por lo tanto un doble sistema de regulación para un mismo operón, (38,35).

ANTECEDENTES

La primera evidencia de la existencia de NifA en *Bradyrhizobium japonicum* se obtuvo al realizar pruebas de hibridación de *nifA* de *K. pneumoniae* con el genoma de *B. japonicum*. Además se encontró que genes *nif* en *B. japonicum* podían activarse específicamente por NifA de *K. pneumoniae* y no por NtrC.

Al secuenciar a *nifA*, se encontró que forma parte de un operón, que se denominó *fixRnifA*. Mutaciones de *fixR* afectaban en un 50 % la fijación de nitrógeno.

Cuando se analizaron las regiones upstream del operón, se determinó la presencia de una secuencia que presenta la región conservada -24/-12, que corresponde al típico promotor σ^{54} . Sin embargo, mutaciones en la región -24 no afectaban la expresión del operón considerablemente, mientras que las mutaciones en -12 tenían una fuerte influencia en la expresión, concluyendo que los dos nucleótidos (GC) de esta región son esenciales para la óptima actividad de este promotor (37).

En la región -124/-109 upstream se encontró una secuencia TGT N10 ACC, que corresponde quizás a las UAS de NifA en este operón (35). La determinación de una regulación positiva y el posible sitio de inicio de transcripción, fueron de los primeros datos que se utilizaron para trabajos posteriores (34).

La activación del operón *fixRnifA* se da tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, siendo 5 veces mayor la activación de la expresión en anaerobiosis. Esto se vio con mediciones de β -galactosidasa, producto de la fusión transcripcional *fixR-lacZ*. Este dato se utilizó para indicar que NifA no es el único elemento que regula este operón, teniendo en consideración que NifA es sensible al oxígeno, se propuso que el operón estaba regulado por otra proteína diferente a NifA y NtrC. Este dato se corroboró con cepas mutantes en *nifA*, donde seguían habiendo actividad en aerobiosis y anaerobiosis (37).

Al intentar conocer de qué manera se regulaba el operón *fixRnifA*, se vió que estaba sujeto quizás a un doble sistema de regulación positiva, y *NifA* autoactivaba su expresión en anaerobiosis actuando en *cis*. Esto se vió al hacer integraciones cromosomales de la fusión transcripcional *fixR-lacZ* en la cepa silvestre y en la mutante *nifA*.

Por análisis de deleciones en la región upstream del promotor, se determinó que la región -80 a -50 era necesaria para la expresión aeróbica del operón *fixRnifA*, siendo esta región importante para la activación del operón y muy posiblemente el sitio de unión para una proteína reguladora. Al analizar estas deleciones en geles de acrilamida, se observó el retardamiento electroforético en la migración de fragmentos que tenían por lo menos hasta la región -50 upstream del promotor. Esto se observó al ponerlos con extractos crudos de proteínas de un crecimiento aeróbico de *Bradyrhizobium japonicum*. Con el mismo análisis, se vió que la mutación puntual de A por C en la posición -66 impedía el retardamiento de los fragmentos, además se reducía notablemente la expresión aeróbica de *fixRnifA*.

Para corroborar que en esta región existía otro sitio de unión para una proteína reguladora, se sintetizaron fragmentos de DNA que contenían la secuencia desde la posición -80 a -50, y se observó que era suficiente este fragmento para que existiera un retardamiento en la migración electroforética al ponerlos con extractos crudos de proteína de crecimiento aeróbico de *B. japonicum* (13,38).

En *Bradyrhizobium japonicum* existen dos copias del gene *rpoN*, que codifican para σ^{54} . Con la construcción de una doble mutante *rpoN1/2*, se encontró que afectaba totalmente la fijación de nitrógeno por no presentarse la existencia del factor σ^{54} que es esencial para la activación transcripcional de los genes *nif* y *fix* involucrados en este proceso. La utilización de esta doble mutante sirvió para sugerir la existencia de un sistema de regulación *NifA* y σ^{54} independiente, ya que el operon *fixRnifA* seguía expresándose con la mutante *rpoN1/2* en aerobiosis.

La proteína reguladora NifA y la copia *rpoN1* se encuentran inactivas en presencia de oxígeno, estando mediada la regulación de esta última por los genes *fixLJ*. Por lo tanto, la expresión aeróbica del operón no está mediada por NifA y σ^{54} , activándose otro sistema de regulación tanto aeróbica como anaeróbicamente para la expresión del operón *fixRnifA*, como se había visto anteriormente (24).

Trabajos previos de Morett, *et al.* (1993) han mostrado la existencia de un doble inicio de transcripción para el operon *fixRnifA*, en donde estos transcritos se encuentran separados únicamente por dos nucleótidos; esto se observó con cepas mutantes en NifA, RpoN y en la cepa silvestre.

Con todos los datos anteriores, se ha propuesto un sistema de regulación que está dentro de una de las dos cascadas mediadas por oxígeno en *Bradyrhizobium japonicum* (18). La regulación de la transcripción del operón *fixRnifA* está regulado por oxígeno en dos puntos (Fig.4.): En NifA, que activa la transcripción anaeróbicamente de los genes *nif* y *fix* presentando sensibilidad a altas tensiones de oxígeno (10,23), y por la activación anaeróbica de FixL que permite la fosforilación de FixJ. Esta proteína activa la transcripción de *rpoN1*, que es esencial para transcribir *fixRnifA* en presencia de NifA, siendo este sistema dependiente de NifA y σ^{54} (Fig.5)(1).

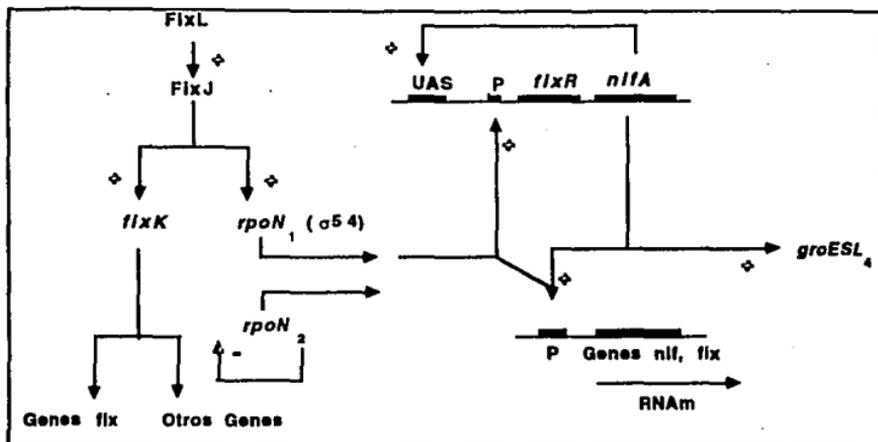


Fig. 4

Doble cascada de regulación por oxígeno en la expresión de los genes *fix* y *nif* en *B. japonicum*

El otro sistema de regulación es independiente de *NifA* y σ^{54} , conociéndose únicamente que existe un factor de regulación positivo que se une en la región -66, y que la región -12 es esencial para la transcripción aeróbica del operón. De esta manera, se propone la existencia de un doble sistema de regulación transcripcional siendo uno de ellos dependiente de *NifA* y σ^{54} expresándose únicamente en anaerobiosis y un segundo sistema que se activa por una proteína diferente a *NifA* y utilizando un factor σ distinto de σ^{54} (Fig.6)(35).

El objetivo general de este trabajo es entender la regulación a la que está sujeta el operón *flxRnifA* en condiciones aeróbica y anaeróbicamente.

El comprender el alto grado de fineza con el que se regula la transcripción de este operón, será de mucha utilidad para entender los sistemas de regulación de otros organismos, a donde se extrapolarán varios de los datos que se encuentren.

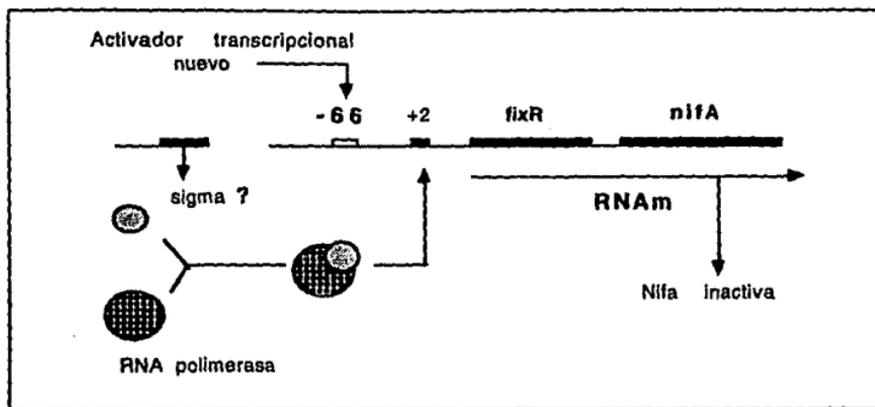


Fig. 6
Sistema de regulación NifA independiente

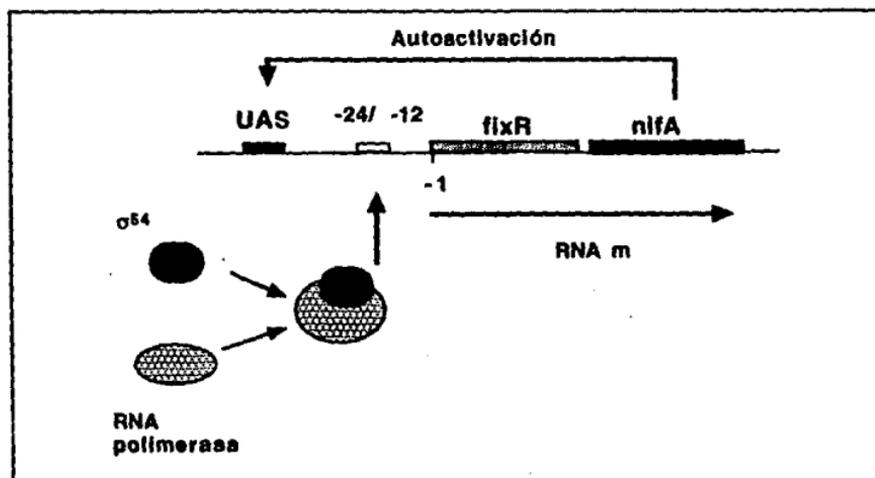


Fig. 5
Sistema de regulación NifA dependiente

OBJETIVOS

Nuestro objetivo es entender los mecanismos de regulación transcripcional a los que se encuentra sujeto el operón *fixRnifA* de *B. japonicum*, y en qué condiciones se expresa cada uno de estos mecanismos.

Para cubrir estos objetivos cuantificaremos la expresión de la fusión transcripcional *fixR-lacZ* que se encuentra integrada a cromosoma (ver FIG.10), de las 6 cepas enlistadas en la tabla 1, (ver construcciones Fig.,8,9 y10), y por otro lado se determinarán los inicios de transcripción de las 6 cepas crecidas aeróbica y anaeróbicamente.

Con la correlación de ambos objetivos pretendemos caracterizar mejor la regulación transcripcional del operón *fixRnifA*, elucidando cuál de los dos inicios de transcripción reportados corresponden para el sistema *NifA* dependiente, al independiente y en qué condiciones se expresa cada uno de los dos sistemas propuestos (FIG. 5 y 6).

METODOLOGIA

Para la realización de este trabajo experimental se utilizaron las cepas que se muestran en la tabla 1, las cuales tiene una fusión transcripcional de 14 codones de *fixR* y el promotor del operón *fixRnifA* con el gene completo de *lacZ* que codifica para la β -galactosidasa. Así, cuando se activa la transcripción del operón *fixRnifA*, se transcribe *lacZ* que utilizamos como gen reportero y podemos ver los niveles de expresión en las diferentes cepas y condiciones.

CEPA	MARCADOR	GENOTIPO
E.coli MC1061		
<i>B.japonicum</i> :		
8085	Tc, Sp	<i>fixR-lacZ</i> fig.10
8091	Tc, Sp	<i>fixR-lacZ</i> (A -66 por C) fig.10
AB085	Tc, Sp, Km	<i>fixR-lacZ nifA::Tn5</i> fig.8-10
A8091	Tc, Sp, Km	<i>fixR-lacZ</i> (A -66 por C) <i>nifA::Tn5</i> fig.8-10
N8085	Tc, Sp, Km, Sm	<i>fixR-lacZ rpoN1::aphII rpoN2::Ω</i> fig.9-10
N8091	Tc, Sp, Km, Sm	<i>fixR-lacZ</i> (A-66 por C) <i>rpoN1::aphII rpoN2::Ω</i> fig.10
Plasmido:		
pRj7211	Amp	<i>fixR-lacZ</i> fig.7

TABLA I

Las 6 cepas fueron construidas por el Dr.Hans-Martin Fischer para propósitos de este trabajo (ver construcciones FIG. 7, 8, 9 y 10).

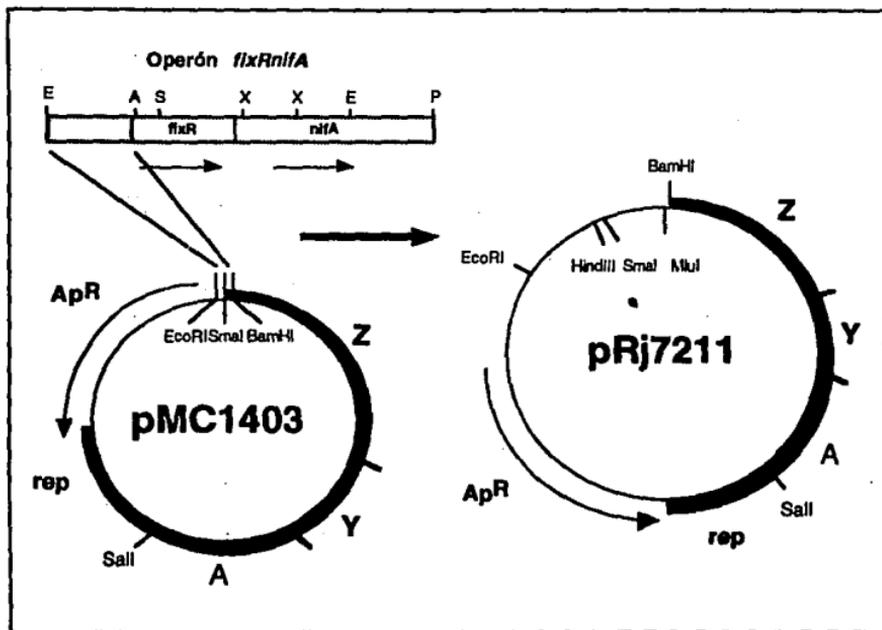


Fig. 7
Construcción del pRj7211

Construcción del plásmido pRj7211: Este plásmido se deriva del pMC1403, que presenta sitios de restricción EcoRI y BamHI. En estos sitios se ligó el fragmento de 840 pb EcoRI-AvaII del operón *fixRnifA*. El sitio AvaII fué rasurado y sustituido por un sitio de restricción BamHI. El producto fué el plásmido pRj7211, con el fragmento del promotor de *fixR* y 14 codones del operón *fixRnifA* fusionados con el gene de la β -galactosidasa (*lacZ*), conservando la resistencia a la Ampicilina del plásmido pMC1403. (Thöny *et al.* 1987)

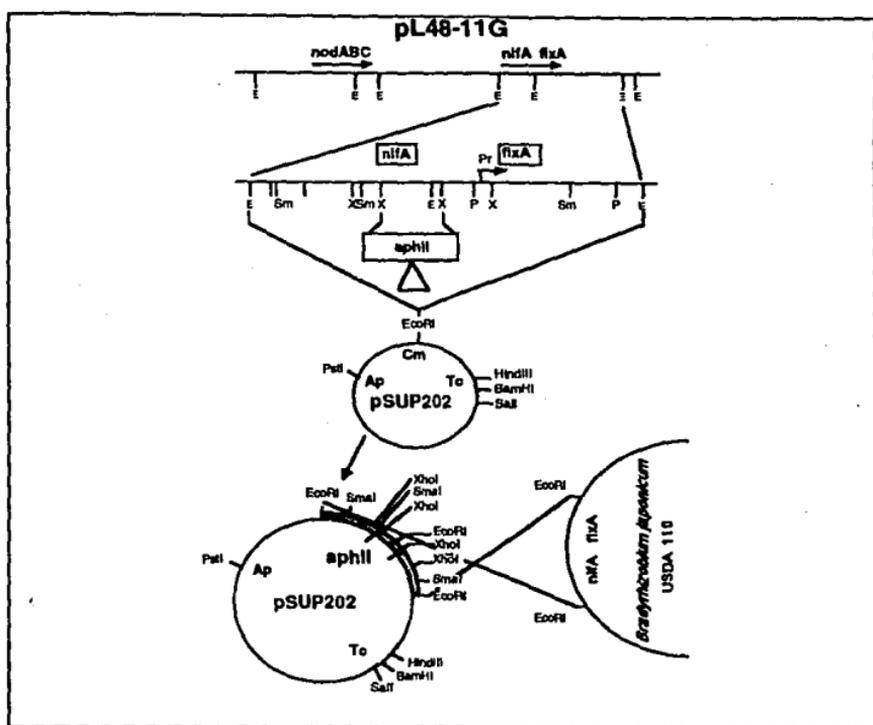


Fig. 6
Mutante *nifA*⁻

Esta mutante se realizó utilizando el fragmento del genoma de *Bradyrhizobium japonicum* bordeado por los sitios de restricción EcoRI que se encuentra en el cósmido pL48-11G. Este fragmento tiene dos sitios de restricción XhoI, que están internos a *nifA*, los cuales se utilizaron para cortar esta región y en donde se ligó el gene *aphII* del Tn5 que confiere resistencia a la Kanamicina. El pL48-11G se digerió con EcoRI y el fragmento con el gene *aphII* en *nifA* se ligó en el sitio EcoRI del pSUP202. Este plásmido se movilizó a la cepa USDA110 de *B.japonicum*, en donde se integró por recombinación homóloga perdiendo el vector e integrando la mutante *nifA* con resistencia a la Kanamicina, esta cepa se le llamó A9. (Fischeret al.1986)

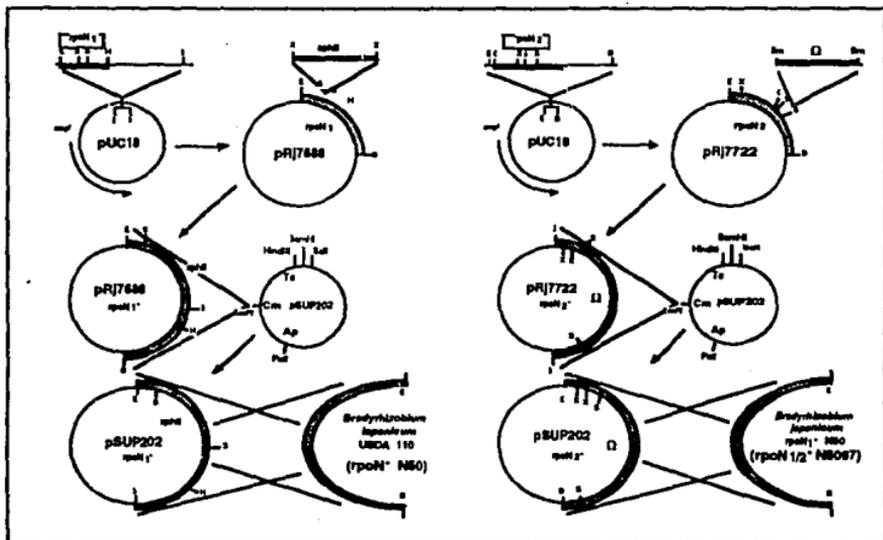


Fig. 9
Doble mutante $rpoN^{1/2}$

Se utilizó el plásmido pRJ7688 que se deriva del pUC18. En este último se integró el fragmento de 4.1 Kb EcoRI-BamHI, en donde se encuentra $rpoN_1$. Este pRJ7688 se digirió con Sall, este fragmento de 258 pb se substituyó por el fragmento XhoI de 2347pb del Tn5 que tiene el gene $aphII$ que confiere resistencia a Kanamicina (km). El fragmento de 6.1 Kb EcoRI-BamHI del pRJ7688 se integró en el sitio EcoRI del pSUP202. Este último se transfirió a *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 por recombinación homóloga, dando como resultado la cepa N50. Para la mutante $rpoN_2$, se utilizó el plásmido pUC18, al cual se le integró el fragmento de 9Kb EcoRI-BamHI donde se encuentra la copia $rpoN_2$ para dar lugar al pRJ7722. Este se digirió con Sall y el fragmento interno de 258 pb de $rpoN_2$ se substituyó por el fragmento SmaI de 2Kb del interposón omega que confiere resistencia a estreptomycin (Sm). El fragmento EcoRI-BamHI de 10.7Kb se clonó en el sitio EcoRI del pSUP202, que se movilizó a la cepa N50, en donde se integró por recombinación homóloga, dando como resultado la cepa N5097 doble mutante $rpoN_{1/2}$ con marcadores Km y Sm. (Kullik *et al.* 1991)(16,22)

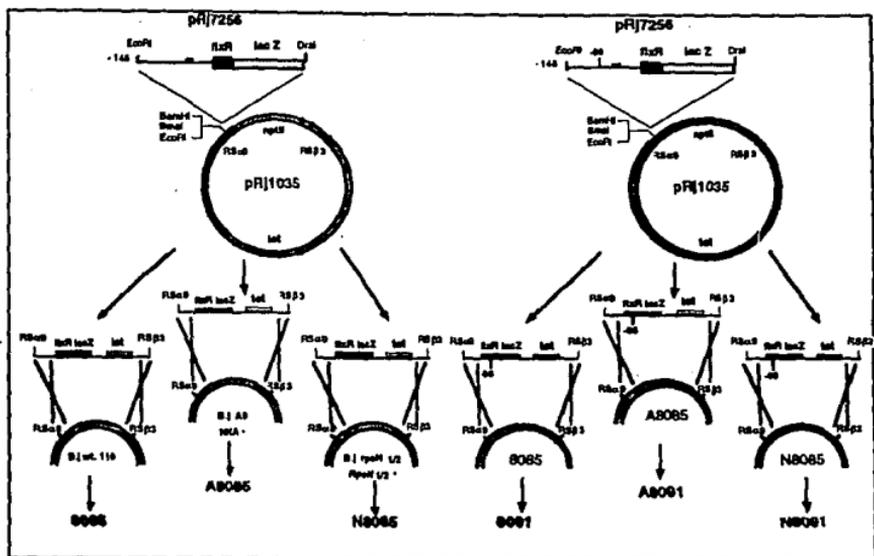


Fig. 10
Cepas con la fusión *fixR-lacZ*

Se utilizó el fragmento de 3.33Kb EcoRI-DraI del plásmido pRJ7256 que tiene la fusión *fixR-lacZ*, este fue clonado en los sitios EcoRI-SmaI del plásmido pRJ1035, que se integró a las cepas wt.USDA 110 de *Bradyrhizobium japonicum*, A9 (Nif⁺) y en la N5097 1/2 (RpoN⁻), por doble recombinación en las regiones no esenciales RS α 9 y RS β 3, dando como resultado las cepas 8085, A8085 y N8085. En estas cepas se integró el marcador a tetraciclina (*tet*) con la fusión *fixR-lacZ*. Para la construcción de las mutantes en -66, se utilizó el fragmento de 840 pb EcoRI-BamHI del plásmido pRJ7256 para hacer una mutagenesis dirigida de A por C en el sitio -66 upstream del sitio de inicio de transcripción de *fixR-lacZ*, este fragmento se reclona en el pRJ7256, el fragmento de 3.33Kb EcoRI-DraI del plásmido pRJ7256 que tiene la fusión *fixR-lacZ* con la mutante, se integró a las cepas 8085, A8085 y N8085 por doble recombinación en las regiones no esenciales RS α 9 y RS β 3 (16,22), dando como resultado las cepas 8091, A8091 y N8091.

Ensayos de β -galactosidasa

Las 6 cepas se crecen aeróbicamente en PSY (Ap.1) con sus respectivos antibióticos, con una agitación constante de 350 rpm a 30°C. Los cultivos se inoculan en 100 ml de medio en matraces de 500 ml a una absorbancia de 0.05 a 560 nm. Se crecen durante 72 hrs, cuando tiene aproximadamente una absorbancia de 0.8 a 560nm. Los cultivos se centrifugan a 10000 rpm durante 8 min a 4°C. Se decantan y se resuspenden en 10 ml de buffer de fosfatos (Ap.II). Se toma 1 ml de células y se centrifugan a 14000 rpm durante 3 min, se resuspenden en 900 μ l de buffer Z (Ap.III) y se mide su absorbancia a 600 nm. Las células se lizan con 70 μ l de SDS al 2% y con 30 μ l de cloroformo, se agitan vigorosamente por 30 seg. Estas muestras se incuban 5 min a 30°C, la reacción se inicia con 50 μ l de ONPG 16mg/ml agitando unos segundos. Se toma el tiempo de la reacción hasta que esta toma un color amarillo claro. La reacción se para con 250 μ l de Na_2CO_3 2M. Centrifugar durante 2 min a 14000 rpm, se lee su absorbancia a 420nm. La producción de o-nitrofenol es proporcional a la cantidad de enzima presente (β -galactosidasa) y se reporta en unidades Miller con la siguiente formula (22):

$$\text{UM} = 1000 \times \text{D.O } 420\text{nm} / \text{txVxD.O } 600\text{nm}$$

Para determinar la expresión microaeróbicamente, se crecen las 6 cepas de *B. japonicum* sin antibióticos en botellas de 160 ml con 155 ml de YEM (AP.IV). Para que se encuentren en ausencia de oxígeno, éste se desplaza con argón. Los medios se inoculan a una absorbancia de 0.1 a 560nm. Se crecen a 30°C a 250 rpm durante 48 hrs. La cuantificación de la β -galactosidasa se realiza como se describió anteriormente.

Células competentes de Ca⁺⁺

La cepa MC1061 se inocula en 25 ml de LA (AP. V), se crecen a 250 rpm a 37°C, hasta que alcance una absorbancia de 0.8 a 540 nm. Centrifugar las células 5 min a 5000 rpm (A partir de este punto se mantiene en hielo). Resuspender las células en 1/2 volumen de inicial con CaCl₂ 0.1 M, se dejan incubando en hielo 20 min, centrifugar 5 min a 5000 rpm y resuspenderlas en 1/10 del volumen inicial con CaCl₂ 0.1 M, se congelan a -70°C con glicerol al 50%.

Transformación de las células competentes con el plásmido pRJ7211

Se utilizan 100 µl de células competentes MC1061 con 0.3 µg del pRJ7211, se agitan e incuban 20 min en hielo, calentar 2.5 min a 42°C sin agitar, ponerlas en hielo y diluir en 1 ml de LA. Dejar durante 1 Hr a 37°C, centrifugar 1 min y retirar el sobrenadante para resuspender en 100 µl de LA. Se platean en cajas de LA con Amp 50 µg/ml y se dejan crecer a 37°C hasta obtener colonias aisladas de la MC1061/pRJ7211 Amp resistentes.

Extracción del plásmido pRJ7211

Inocular la MC1061/pRJ7211 en 500 ml de LA con Amp durante una noche a 37°C con una agitación de 250 rpm. Centrifugar las células 8 min a 10000 rpm, decantarlas y resuspenderlas en 50 ml de una solución fría de GET (AP. VI) con 400 µg de lisozima, dejarla 5 min a temperatura ambiente, agregar 100 ml de SDS 1% y NaOH 0.2N, agitar invirtiendo e incubar 5 min en hielo, Agregar 75 ml de Ac de K (AP. VII) y centrifugar 10 min a 10000 rpm. Tomar el sobrenadante y precipitar con

0.6 volúmenes de isopropanol al 100%, dejando a -70°C durante 20 min, centrifugar 8 min a 10000 rpm, limpiar el exceso de sal con etanol al 70%, secar y resuspender en 10 ml de agua, tratar con RNAsa 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hr a 37°C . Extraer con un volumen igual de fenol agitando, centrifugar 10 min a 10000 rpm, tomar el sobrenadante y ponerle un volumen igual de cloroformo, agitar y centrifugar 10 min a 10000 rpm. Tomar el sobrenadante y precipitar con 1/10 del volumen inicial con AcNa 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100% dejando a -70°C durante 30 min. Centrifugar 8 min a 10000 rpm, decantar y limpiar con etanol al 70%, secar la pastilla del DNA y resuspender en 1 ml de agua desionizada.

Purificación del pRI7211 por gradiente de CsCl_2

Tomar 500 μl del plásmido y aforarlos a 8 ml con agua desionizada, agregar 8 gr de CsCl_2 quedando aproximadamente en 11 ml, agregar 880 μl de bromuro de etidio 10 mg/ml . Poner en 4 tubos de 5 ml para gradiente. Los tubos, en caso de ser necesario se llenan con una solución de CsCl_2 y bromuro de etidio que tenga una densidad final de 1.55 gr/ml . Centrifugar con el rotor VT150 a 50000 rpm durante 16 hrs. Sacar la banda de DNA circular.

Limpia el DNA del plásmido con un volumen igual de isobutanol, agitando para centrifugar 5 min a 3000 rpm, esto se realiza 4 veces. Precipitar agregando 3 volúmenes de agua y 2 volúmenes finales de etanol al 100% dejando 30 min a -70°C . Centrifugar 8 min a 10000 rpm, decantar y limpiar la pastilla con etanol al 70%, para secar y resuspender en 200 μl de agua desionizada. El DNA se chequea digiriéndolo con 10 $\text{u}/\mu\text{l}$ de las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y corriendo por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (AP. VIII).

Extracción de RNA

Las cepas se crecen aeróbica y microaeróbicamente de la misma manera como se describe para realizar los ensayos de β -galactosidasa. Centrifugar las células de los cultivos 10 min a 10000 rpm, decantar y ponerlas en hielo. Las células se resuspenden en 3 ml de buffer de fosfatos (AP.II), centrifugar, decantar y resuspender en 400 μ l de RIB (AP.IX) y agregar 500 μ l de fenol ácido. Ambos deben de estar a 65°C. Dejar incubando 5 min, centrifugar 10 min a 14000 rpm, tomar el sobrenadante y extraerlo con un volumen igual de cloroformo, centrifugar 10 min a 14000 rpm, tomar el sobrenadante y extraerle el RNA con el RNAid Kit de Bio 101, Inc. Se ponen 3 volúmenes de NaClO₄ con el sobrenadante de la lisis y 5 μ l de resina para RNA dejando 5 min a temperatura ambiente, agitando constantemente. Centrifugar 1 min a 14000 rpm, decantar, resuspender en 500 μ l de solución de lavado para RNA con etanol al 100%, centrifugar 1 min a 14000 rpm, decantar y resuspender en 60 μ l de agua desionizada tratada con DEPC 0.1%, dejar incubando 5 min a 55°C, centrifugar 2 min a 14000 rpm y tomar el sobrenadante con el RNA total en disolución. El RNA se checa corriendo por electrofóresis en un gel de agarosa al 1% tratado con DEPC 0.1%.

Secuencia del pRj7211

Se utiliza el método de Sanger *et al.* (1977) con el kit de secuenasa versión 2.0 de USB Biochemical. El DNA se desnaturaliza tomando 5 μ l del pRj7211 (20 μ g) y se lleva a 10 μ l con agua, se le agrega 90 μ l de NaOH 0.22 N y 1 μ l de EDTA 20 mM, se calienta 2 min a 90°C, se baja la temperatura con hielo, agregar 10 μ l de NaAc pH4.5 y 200 μ l de etanol al 100%, precipitar poniendo 30 min a -70°C, centrifugar, decantar y limpiar con etanol al 70%, secar y resuspender en 7 μ l agua.

Al DNA se le agregan 2 μ l de Rx buffer (AP.X) y 1 μ l de oligo marcado radioactivamente con 32 P (ver marcación de oligos). Calentar 3 min a 90°C y dejar descender la temperatura lentamente hasta 37°C para que hibridice el templado con el primer. Adicionar 1 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de Mn buffer (AP.XI), 3 μ l de agua y 0.5 μ l de secuenasa 13 u/ μ l. Se toman 3.5 μ l de esta mezcla y se ponen en 4 tubos con 2.5 μ l de las siguientes mezclas:

ddG- dGTP 80uM, dATP 80uM, dTTP 80uM, dCTP 80uM, ddGTP 8uM y NaCl 50mM.

ddA- dGTP 80uM, dATP 80uM, dTTP 80uM, dCTP 80uM, ddATP 8uM y NaCl 50mM.

ddT- dGTP 80uM, dATP 80uM, dTTP 80uM, dCTP 80uM, ddTTP 8uM y NaCl 50mM.

ddC- dGTP 80uM, dATP 80uM, dTTP 80uM, dCTP 80uM, ddCTP 8uM y NaCl 50mM.

Se incuban 30 min a 37°C, la reacción se detiene con 4 μ l de solución stop (AP.XII), se cargan en un gel de acrilamida 6% (AP.XIII) y se corren 3 hrs a 70W.

Extensión del primer

Se toman 18 µl de RNA, adicionarles 0.8 µl de NaCl 5 M, 0.66 µl de Tris 1M pH8 y 1 µl de oligo marcado con ³²P. La hibridización se hace calentando a 90°C durante 3 min y se deja descender la temperatura lentamente hasta 40°C. Las reacciones de extensión se hacen adicionando 0.5 µl de RNAsa Inhibidor 100 u/µl, 7.2 µl RT buffer (AP.XIV), 3.7 µl DTT 10 mM, 3.7 µl BSA 1mg/ml, 1 µl dNTP's 40 mM y 0.5 µl RT RAV-2 18 u/µl. Incubar 1 hr a 42°C. Se precipita con 10 µl de NH₄ Ac 10 M, 100 µl de etanol al 100% y dejar 30 min a -70°C, centrifugar y limpiar con etanol al 70%, secar, resuspender con 6 µl de agua y 4 µl de solución stop. Correr en PAGE 6% 3hrs.

Marcale de Oligos

Los oligos EM33, lac 3 y lac 4 (Tabla.2) se fosforilan utilizando 5 µl de oligo (5pmol); se mezclan con 2 µl de PNK buffer 5x (AP. XIV), 2.7 µl de ^γ32P ATP (5.4nmol) y 0.3 µl de PNK 8 u/µl, incubar 1 hr a 37°C y 10 min a 70°C.

Los oligos se purifican con las columnas NENSORB 20, la columna se hidrata con 1 ml de metanol 100% y se estabiliza con 2 ml de buffer A (AP.XVI), se pone el oligo marcado y se pasa por la columna con 3 ml de buffer A para quitar la marca no incorporada. Se eluye el oligo marcado con 1 ml de n-propanol al 20%, se toman alícuotas, se secan y resuspenden en 10 µl de agua. Estos oligos limpios se utilizan para las reacciones de secuencia y extensión del primer.

OLIGOS	SECUENCIA
EM33	5` TCATTGGCAGATCGAGACCCACGGCCGCCTCC 3`
lac 3	5` CAAGGCGATTAAGTTGG 3`
lac 4	5` AGTTGGGTAACGCCACGG 3`

TABLA 2. Oligonucleótidos sintéticos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de la expresión del operón *fixRnifA* por medio de la fusión *fixR-lacZ*

Se ha propuesto que el operón *fixRnifA* presenta un doble sistema de regulación, siendo uno de ellos independiente de la proteína reguladora NifA. Se ha visto que la mutante de A por C en la posición -66 upstream del inicio de transcripción disminuye la expresión del operón *fixRnifA* en condiciones aeróbicas, dicha región -66 está propuesta como sitio de unión de un factor regulador que se ve afectado por la mutación. La expresión de estas mutantes han sido observadas únicamente en plásmido. El otro sistema mas caracterizado, presenta una regulación por NifA la cual es inactiva en presencia de oxígeno y en bajas concentraciones de este elemento el operón es regulado positivamente por NifA (autoregulación) (Thöny *et al.* 1989).

Nosotros determinamos la expresión del operón *fixRnifA* utilizando las 6 cepas de *B. japonicum* (Tabla. 1), que presentan la fusión de la región promotora y 14 codones de *fixR* con el gen reportero *lacZ* que se encuentra integrada al genoma (Fig.10) para ver en qué condiciones se expresaba cada uno de los sistemas propuestos.

La expresión de la fusión *lacZ* se midió al crecer las cepas aeróbicamente en PSY, ya que la inducción de la expresión de la fusión en YEM no se veía claramente. La actividad de β -galactosidasa expresada en unidades Miller de las cepas 8091, A8091 y N8091, es afectada por la mutación en la región -66, comparándola con la 8085, A8085 y N8085 respectivamente tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, como se ve en la Tabla 3.

La expresión de las cepas 8085, A8085 y N8085 en aerobiosis es casi la misma siendo 5 veces menor comparada con la 8085 en anaerobiosis, dicha expresión debe de pertenecer a la activación del sistema NifA independiente por ser

el NifA dependiente inactivo en aerobiosis, por otro lado las cepas 8091, A8091 y N8091 con la mutación en -66 no presentan expresión, debido a que esta mutación afecta al sistema NifA independiente como lo había reportado Thöny *et al.* 1989 (Ver tabla 3).

EXPRESION DE LA FUSION *fixR-lacZ* EN UNIDADES MILLER DE

B-GALACTOSIDASA			
CEPA	GENOTIPO	Aeróbico	Microaeróbico
8085	<i>fixR-lacZ</i> , silvestre	271	1690
8091	<i>fixR-lacZ</i> , A-66 por C	9	1200
A8085	<i>fixR-lacZ</i> , <i>nifA</i> ⁻	193	230
A8091	<i>fixR-lacZ</i> , <i>nifA</i> ⁻ , A-66 por C	6	41
N8085	<i>fixR-lacZ</i> , <i>rpoN</i> ⁻	140	735
N8091	<i>fixR-lacZ</i> , <i>rpoN</i> ⁻ , A-66 por C	6	32

TABLA. 3.

La inducción en la expresión de la fusión *fixR-lacZ* en anaerobiosis se logró al crecer las cepas en YEM con KNO₃ como aceptor de electrones.

La expresión en anaerobiosis de la cepa 8085 fué 5 veces mayor en comparación con las cepas que se expresaron en aerobiosis. La cepa 8091 con mutación en -66 tuvo una expresión de 4 veces mayor en comparación con las aeróbicas, esta disminución de la expresión se debe a que el sistema NifA independiente no se activa por la mutación en -66 y por lo tanto toda la expresión de la cepa 8091 es debida al sistema NifA dependiente y en la 8085 la expresión es la suma de la activación de los dos sistemas tanto del NifA dependiente como independiente.

En la cepa A8085 la expresión es 5 veces menor en comparación con la 8085, ya que el sistema *NifA* independiente es el único activo por ser la cepa mutante en *nifA*. En el caso de la cepa A8091 no se ve expresión porque los dos sistemas están mutados, tanto en *NifA* como en la región -66.

La cepa N8085 en condiciones anaeróbicas tiene una expresión 3 veces mayor en comparación con las cepas aeróbicas. Esta expresión debe de pertenecer al sistema *NifA* independiente ya que la cepa es mutante en σ^{54} y por lo tanto el sistema *NifA* dependiente no se activa. El mayor nivel de expresión en anaerobiosis comparado con el de aerobiosis nos sugiere que el activador del sistema *NifA* independiente está sujeto a una regulación por oxígeno. En el caso de la cepa N8091 no hay expresión de ninguno de los sistemas por encontrarse mutados, tanto en σ^{54} como en la región -66.

Estos resultados sugieren la existencia de un doble sistema de regulación para el operón *fixRnifA*, donde el sistema *NifA* independiente se expresa tanto aeróbica como anaeróbicamente, siendo la región -66 esencial para su activación y donde participa un regulador positivo que quizás es sensible al oxígeno y otro factor sigma distinto a σ^{54} como se ve en la expresión anaeróbica de la cepa N8085. En cambio el sistema *NifA* dependiente solo se expresa en anaerobiosis y la mutación en -66 no lo afecta como se ve en la expresión anaeróbica de la cepa 8091; contrario a lo que pasa con mutaciones en la proteína *NifA* y en el factor σ^{54} , ambos necesarios para activar la expresión del sistema *NifA* dependiente en anaerobiosis como otros que ya se han caracterizado. Los ensayos de β -galactosidasa se llevaron acabo por lo menos 5 veces en experimentos independientes.

Mapeo de inicio de transcripción

Teniendo en cuenta los datos de β -galactosidasa y los resultados previos de Morett *et al.*(1993) de los dos inicios de transcripción, realizamos el mapeo de inicios de transcripción para determinar cuál de los dos inicios de transcripción reportados se utilizan para cada uno de los dos sistemas de regulación que se han propuesto para la expresión del operon *fixRnifA*.

Para hacer el mapeo de inicio de transcripción de las 6 cepas crecidas tanto aeróbica como anaeróticamente, se obtuvo primero la secuencia del plásmido pRj7211 (Fig.7) que se utilizó como marcador del inicio de transcripción. La secuencia se hizo utilizando 25 ug del pRj7211 purificado por CsCl₂, el cual se checó al digerirlo con las enzimas EcoRI y BamHI, de donde se obtuvo un fragmento de 0.84 Kb que corresponde al promotor e inicio del operón *fixRnifA* y el resto del vector de 9.9 Kb (FIG.11).

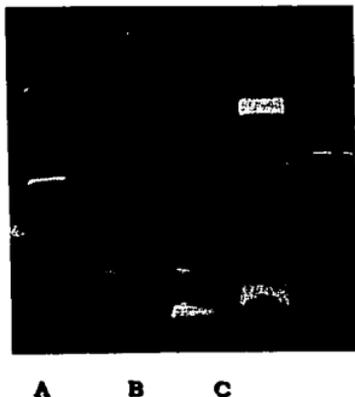


FIG. 11.

Digestión del plasmido pRj7211

Ladder de 1 Kb (A), pRj7211 digerido(B) y pRj 7211 sin digerir (C).

Los inicios de transcripción se determinaron por extensión del primer con transcriptasa reversa, utilizando el oligo *lac 4* como primer y los RNA's de las 6 cepas crecidas en aerobiosis y anaerobiosis como templado para la extensión (FIG.12).

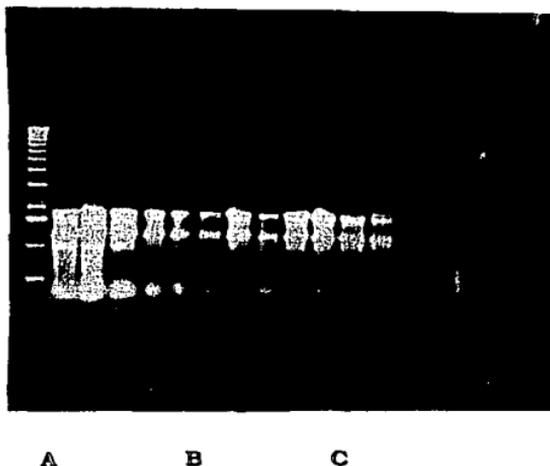


FIG.12.

RNA's purificados de crecimientos aeróbicos y anaeróbicos

A) Ladder de 1 Kb, B) RNA's aeróbicos y C) RNA's anaeróbicos. En B y C las cepas presentan el siguiente orden: 8085, 8091, A8085, A8091, N8085 y N8091.

El oligo EM33 se utilizó para obtener la secuencia del pRJ7211 desde la posición 16 downstream del inicio de transcripción hasta la posición 153 upstream del inicio de transcripción. El oligo 383 *lac 3*, se utilizó para secuenciar desde la posición 115 bases downstream del inicio de transcripción en donde está la fusión *fixR-lacZ* (Fig. 13).

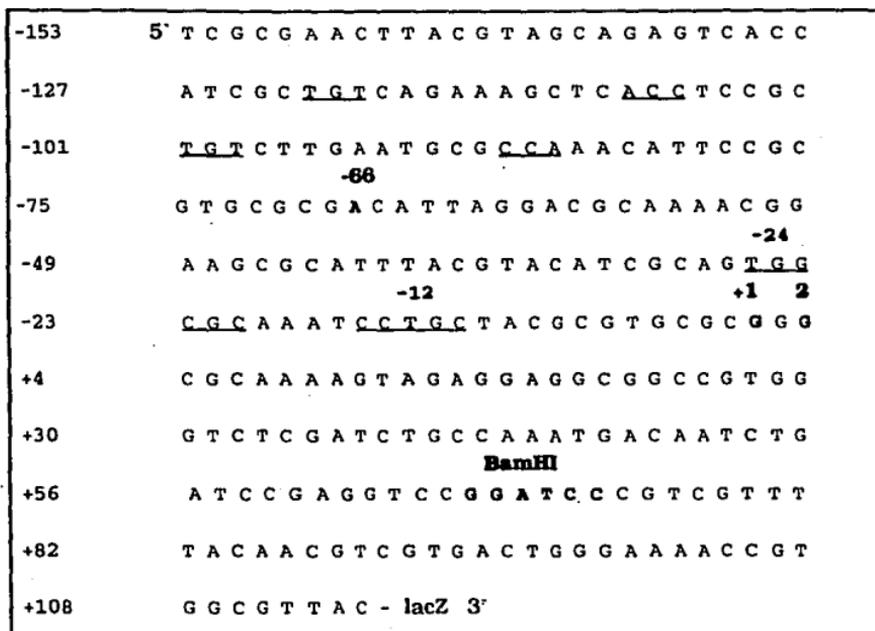


Fig. 13.

Secuencia del promotor *fixR* con la fusión *lac-Z*. Las secuencias subrayadas upstream son posibles sitios de unión para la proteína NifA. La región -66 es donde se realizó el cambio de A por C para construir las cepas mutantes en el sistema de regulación NifA independiente. Las regiones -24 y -12 presentan el típico consenso para promotores sigma 54. Los inicios de transcripción están señalados como 1 y 2. El sitio BamHI denota el linker donde se encuentra la fusión con *lac-Z*.

Al utilizar el oligo EM 33 para realizar la extensión del primer se observaron claramente los 2 inicios de transcripción pero sin poder diferenciar a qué sistema de regulación pertenecía cada uno de los transcritos como se observa en la fig.14, ya que este oligo es complementario tanto a la copia genómica de *fxRnifA* como a la fusión *fxR-lacZ* integrada al cromosoma.

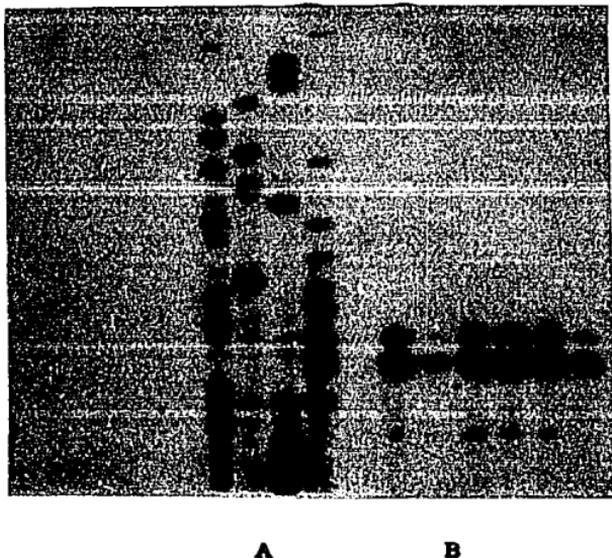


Fig. 14.

Secuencia del pRJ7211 utilizado como marcador de inicio de transcripción (A), inicios de transcripción de las cepas 8085, 8091, A8085, A8091, N8085 y N8091, de crecimientos aeróbicos (B), utilizando el oligo EM33 como primer.

Para realizar el mapeo de transcritos de nuestras 6 cepas utilizamos el oligo *lac 4* que es complementario únicamente a la fusión transcripcional *fixR-lacZ*. En la figura.15 se muestran los inicios de transcripción junto a la secuencias de la región promotora del operón *fixRnifA* que utilizamos como ladder, en el panel B se encuentran los inicios de transcripción de las 6 cepas crecidas anaeróbicamente. La intensidad del transcrito mas largo (denotado como 1), en comparación con el que es dos nucleótidos más corto (denotado como 2) de la cepa 8085, nos hace pensar que el inicio de transcripción del sistema *NifA* dependiente es el mas largo y el corto pertenece al sistema *NifA* independiente tomando en cuenta los datos de β -galactosidasa y que *NifA* autoactiva su transcripción en anaerobiosis. Esto se ve mas claro con los transcritos de la cepa 8091, donde sólo se presenta el transcrito 1 que tiene que corresponder al sistema *NifA* dependiente ya que la mutante en -66 inactiva al sistema *NifA* independiente.

El transcrito 2 de la cepa A8085 presentan una mayor intensidad que debe pertenecer al sistema *NifA* independiente, aunque se ve también el 1 con menor intensidad. Esto puede deberse a que el sistema *NifA* independiente pueda iniciar la transcripción inespecíficamente en este lugar. Al hacer los mapeos con la cepa A8091 no se observó ningún transcrito, interpretándose que la mutante en -66 afecta totalmente la expresión del sistema *NifA* independiente (Thöny *et al.* 1989) y la mutante en *NifA* afecta al sistema dependiente de ella.

En el caso de de la cepa N8085 se ve una mayor intensidad para el transcrito 2 que debe pertenecer a la activación del sistema *NifA* independiente y que por lo tanto debe de utilizar otro factor σ diferente de σ^{54} para su expresión. El transcrito 1 que se observa puede deberse a lo mismo que pasa en la cepa A8085 de un inicio inespecifico del mismo sistema. En el mapeo de la N8091 no se observó ningún transcrito por encontrarse mutados los dos sistemas.

En el caso del mapeo de transcritos de las 6 cepas crecidas aeróbicamente se observa el mismo patrón para la 8085, A8085 y N8085, donde el transcrito 2 es mas intenso y debe de pertenecer a la activación exclusivamente del sistema NifA independiente, ya que el sistema NifA dependiente no se activa en aerobiosis. Esto es claro en la cepa mutante NifA en donde no se ve una diferencia en los transcritos con respecto a la mutante σ^{54} y la silvestre . El transcrito 1 se debe a un inicio inespecífico del sistema como se habia observado en las cepas A8085 crecida anaeróbicamente. En el caso de las cepas 8091, A8091 y N8091 que presentan la mutación puntual en -66 y que afecta la expresión del sistema NifA independiente, no se observó ningún transcrito.

La diferencia en la intensidad del transcrito 2 de la cepa N8085 crecida en anaerobiosis, en comparación con el transcrito de aerobiosis, puede deberse a una regulación por oxígeno del factor regulador que se une en la región -66, presentando una mayor activación en anaerobiosis. Otro factor que puede impedir la activación del sistema NifA independiente en anaerobiosis puede ser la competencia por la misma región promotora entre el σ^{54} y el σ del sistema NifA independiente. Esto se ve en los transcritos anaeróbicos de la cepa N8085 donde el transcrito 2 es bastante intenso por no encontrarse el σ^{54} y por lo tanto, no existiendo una competencia por la misma región promotora, esta competencia se podría estar viendo en el mapeo de transcritos anaeróbicos de la cepa 8085 donde el inicio de transcripción 1 es mas intenso que el 2 por encontrarse σ^{54} presente.

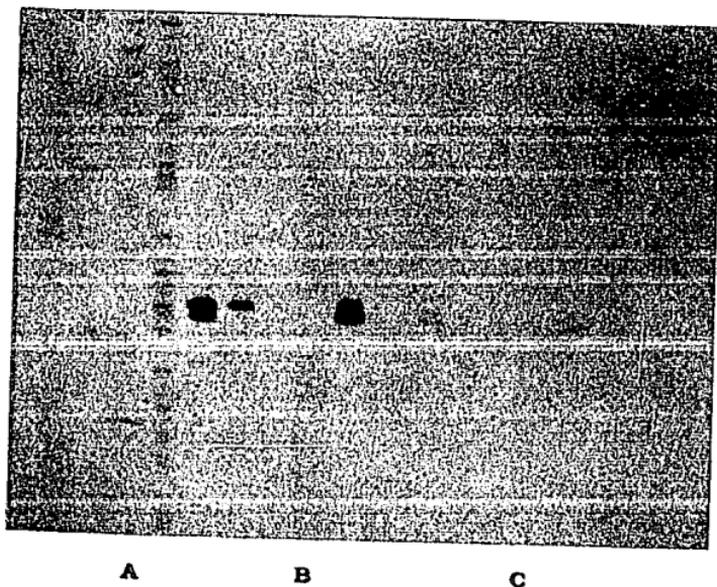


Fig.15

Inicios de transcripción

Secuencia del promotor *fixR* (A), inicios de transcripción de las cepas crecidas anaeróbicamente (B) y aeróbicas (C), las cepas presentan el siguiente orden: 8085, 8091, A8085, A8091, N8085 y N8091.

Los dos inicios de transcripción que determinamos son diferentes a los propuestos inicialmente por Thöny *et al.* 1987, donde se reporta un solo inicio de transcripción y se encuentra desplazado 2 bases upstream de los transcritos que encontramos, siendo uno de los transcritos dos bases más grande al segundo inicio que también determinamos (fig.15 y16).

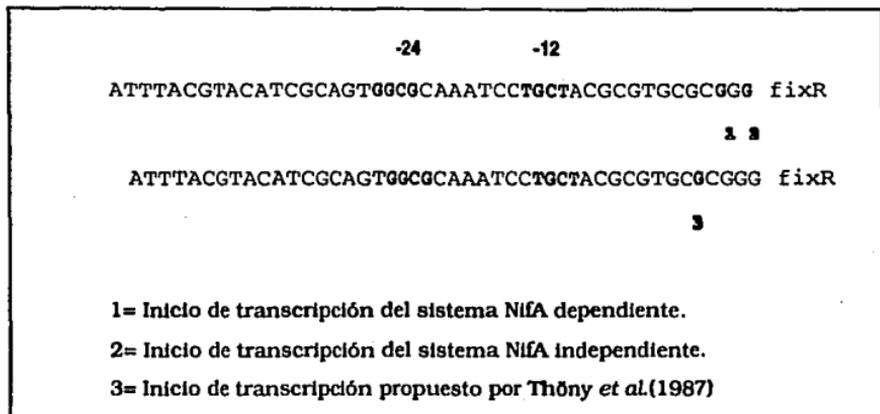


Fig. 16.
Region promotora del operon *fixRnifA* de
Bradyrhizobium japonicum

Posible existencia de otro factor sigma, distinto de sigma 54 para la activación del operón *fixRnifA*

Los promotores de *glnA* y *fbcH* presentan dos regiones con homología localizadas en -35 y -10, que muy posiblemente son reconocidos por un factor σ primario en *B. japonicum*, y no son reconocidos por σ^{54} . Al comparar la secuencia promotora de *glnA* y *fbcH* con el promotor del operón *fixRnifA* se observó que presenta una homología en la región -10 y que carece de ella en la región -35 (Fig.17). Además el operón *fixRnifA* presenta las secuencias consenso para el reconocimiento de σ^{54} en -12 y -24. Por lo tanto, este promotor tiene dos regiones de reconocimiento en -10 y en -24/-12 para dos factores σ distintos, solapandose ambos sobre la misma región promotora. Esta homología existente en la región -10, así como los datos de expresión de β -galactosidasa y mapeo de transcritos de la cepa que es doble mutante en σ^{54} , sugieren fuertemente la participación de otro factor σ diferente a σ^{54} en la activación del operón *fixRnifA*.

Bradyrhizobium japonicum

-35

-10

AATCCGGGCTTGGACGCTATCTGAGCCGGGTGCTATCCCGCATTPTG *glnA*

TTAGCGGGCTTGCGCTCGCCCGCAAGGGTGCCAATAGAACGATTG *fbcH*

ATTTACGTACATCGCAGTGCGCAAATCCTTGCTACGCGTGCGCGG *fixR*

ATTTACGTACATCGCAGTGCGCAAATCCTGTACGCGTGCGCGG *fixR*

-24

-12

1 2

1= Inicio de transcripción del sistema NifA dependiente

2= Inicio de transcripción del sistema NifA independiente

Fig.17.

**Alneamiento de diferentes promotores en
*Bradyrhizobium japonicum***

Por lo general, cuando varios genes se encuentran dentro de un operón están relacionados con una función común, así la existencia de un doble sistema de regulación para el operón *fixRnifA* nos sugiere que el producto de *fixR* presenta una función específica dentro de la fijación de nitrógeno o que tenga alguna relación dentro del sistema. Hasta el momento solamente se sabe que *fixR* presenta una alta homología con deshidrogenasas y mutantes en *fixR* presentan una disminución del 50% en la fijación de nitrógeno.

Nosotros pensamos que quizás el sistema NifA independiente sirve para la expresión de *fixR* tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y que esta proteína tiene la función de reducir a NifA cuando se encuentra oxidada al estar en contacto con el oxígeno, sirviendo *FixR* como parte de un sistema de seguridad para mantener a NifA activa aunque el sistema NifA dependiente no se exprese al existir pequeños cambios en la concentración de oxígeno y por lo tanto no existe una nueva síntesis de NifA.

La existencia de un sistema de regulación tan fino y complejo para el operón *fixRnifA* se puede deber a que el proceso de la fijación de nitrógeno es energéticamente muy costoso. El activar y desactivar de nuevo la síntesis de todas las proteínas y cofactores enzimáticos involucrados en este proceso, requeriría de un gasto de energía bastante alto para la célula, lo que sería bastante difícil de sostener tomando en cuenta que este organismo de vida libre y con capacidad de entrar en simbiosis está sujeto a cambios microambientales en su nicho ecológico, que podrían llevar a la inactivación de NifA por oxidación o que existan señales falsas para activar todo el proceso de fijación de nitrógeno. De ahí que la expresión del activador central de la fijación de nitrógeno que es NifA tenga que ser tan finamente regulada.

CONCLUSIONES

La relación de la existencia de 2 sitios de inicio de transcripción con los resultados de los ensayos de β -galactosidasas, así como la homología existente entre los promotores de *glnA*, *fbhH* que son independientes de σ^{54} con el de *fixR* en la región -10 y la homología entre el consenso de un promotor σ^{54} con *fixR*, apoyan la propuesta de un doble sistema de regulación, donde el inicio de transcripción corto es producto del sistema *NifA* independiente que se expresa 5 veces menos tanto aeróbica como anaeróticamente en comparación con el sistema *NifA* dependiente y se encuentra muy posiblemente regulado por oxígeno. El otro inicio de transcripción, dos nucleótidos más largo, pertenece al sistema *NifA* dependiente que solamente se expresa en anaerobiosis y es 5 veces mayor al otro sistema, siendo dependiente para su activación tanto de σ^{54} como de *NifA*. Por lo tanto, la región promotora del operón *fixRnifA* tiene el solapamiento de 2 sitios de unión para dos factores sigma distintos, siendo uno de ellos σ^{54} y el otro desconocido, aunque proponemos que pueda ser el σ primario de *B. japonicum*. Además, en la activación de este operón *fixRnifA* existen dos proteínas activadoras siendo *NifA* una de ellas y la otra aun desconocida, estando regulada por oxígeno.

Finalmente, en este trabajo describimos dos sistemas de regulación positiva solapados sobre la misma región promotora en donde interviene dos proteínas reguladoras, dos factores σ distintos y quizás dos RNA polimerasas distintas para activar la expresión del operón *fixRnifA*. En bacterias fijadoras de Nitrógeno no se han reportado dobles sistemas de regulación como el descrito en este trabajo. El entender el alto grado de fineza en la regulación de este organismo nos permitirá comprender mejor el complejo sistema de fijación de nitrógeno y la compleja regulación a la que esta sujeto éste y otros procesos.

PERSPECTIVAS

Este trabajo, en el que continuo trabajando para obtener el grado de Maestro en Investigación Biomédica Básica con sede en el CIFN-UNAM bajo el asesoramiento del Dr. Morett, forma parte de un proyecto más amplio que se realiza en colaboración con los Drs. Hans-Martin Fischer y Hauke Hennecke del Instituto de Microbiología en Zurich Suiza.

En posteriores trabajos, se tratará de identificar a la proteína involucrada en la activación del sistema *NifA* independiente así como su posible regulación por oxígeno y funcionalidad en la regulación de otros genes.

Prosiguiendo con el análisis de la región promotora del operon *fixRnifA*, se determinarán los sitios de unión para la proteína del sistema *NifA* independiente y de *NifA*, así como los sitios de unión para la RNA-polimerasa-sigma del sistema *NifA* independiente y el de la RNA-polimerasa- σ^{54} , estos experimentos se llevaran acabo utilizando la técnica de footprinting que sirve para identificar sitios de union de proteínas a DNA en vivo.

Para probar la existencia de dos sistemas de regulación involucrados en la expresión del operón *fixRnifA* en diferentes condiciones, se tratará de separar los dos sistemas genéticamente, mediante mutagénesis oligo-dirigida por PCR en los nucleótidos de la región -10 del promotor.

Por último, se tratará de identificar y relacionar la función del producto de *fixR* con la existencia de un doble sistema de regulación, para poder explicar la existencia de una regulación con alto grado de fineza para el operón *fixRnifA*.

REFERENCIAS

- 1. Anthamatten, D., and H. Hennecke.** 1991. The regulatory status of the *fixL*- and *fixJ*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 225:38-48.
- 2. Barbour, M., Wang, S-H., and Staley, G.** 1992. Molecular genetics of *Bradyrhizobium japonicum* symbioses. In *Biological Nitrogen fixation*. Stacey, G., R. A. Burris, and H. J. Evans (eds.). Chapman and Hall, London.
- 3. Buck, M., Miller, S., Drummond, M., and Dixon, R.** 1986. Upstream activator sequences are present in the promoter of nitrogen fixation genes. *Nature.* 320:374-378.
- 4. Buck, M.** 1986. Deletion analysis of the *Klebsiella pneumoniae* Nitrogenase promoter: Importance of spacing between conserved sequences around position -12 and -24 for activation by the *nifA* and *ntrC* (*glnG*) products. *Journal of bacteriology.* 166:545-551.
- 5. Buck, M., W. Cannon, and J. Woodcock.** 1987. Transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae* Nitrogenase Promoter may Involved DNA-loop Formation. *Mol. Microbiol.* 1:243-249.
- 6. Collado-Vides, J., B. Magasanik and J. G. Gralla.** 1991. Control Site Location and Transcriptional Regulation in *Escherichia coli*. 55:371-394.

- 7. David, M., M-L. Daveran, J. Batut., A. Dedieu., O. Domergue., J. Ghal., C. Hertig., P. Bolstard and D. Kahn.** 1988. Cascade Regulation of *nif* Gene Expression in *Rhizobium meliloti*. Cell. 54:671-683.
- 8. Drummond, M., P. Whitty, and J. Wootton.** 1986. Sequence and Domain Relationships of *ntnC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: Homologies to other Regulatory Proteins. EMBO. J. 5:441-447.
- 9. Fischer, H-M., Alvarez-M, A, and Hennecke. H.** 1986. The Pleiotropic Nature of Symbiotic Regulatory Mutants: *Bradyrhizobium japonicum nifA* Gene Expression and Formation of Determinate Symbiosis. EMBO. 5:1165-1173.
- 10. Fischer, H-M., and Hennecke. H.** 1987. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-mediate *nif* gene regulation to cellular oxygen status. Mol. Gen Genet. 209:621-626.
- 11. Fischer, H-M., T. Bruderer, and Hennecke, H.** 1988. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum NifA* protein: Identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. Nucl. Acids Res. 16:2207-2224.
- 12. Fischer, H. M., S. Fritsche, B. Herzog, and H. Hennecke.** 1989. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum NifA* protein. FEBS lett. 255:167-171.

- 13. Fischer, H-M., D. Anthamatten, I. Kullik, E. Morett, G. Acuña, and Hennecke. H.** 1991. Complex regulatory network for *nif* and *fix* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. In: H. Hennecke and D. P. S. Verma (eds.), Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp.203-210.
- 14. Gilbert. W, and Maxam. A.** 1980. Sequencing end-labeled DNA with Base-specific chemical cleavages. Methods in Enzymology. 65:499-576.
- 15. Gralla. J, and Dwight. S.** 1989. KMnO₄ as a probe for Lac Promoter DNA melting and Mechanism in vivo. Journal of Biological Chemistry. 264:8074-8081.
- 16. Hahn. M. and Hennecke Hauke.** 1987. Mapping of a *Bradyrhizobium japonicum* DNA Region Carrying Genes for Symbiosis and an Asymmetric Accumulation of Reiterated Sequences. Appl. Environ. Microbiol. 53:2247-2252.
- 17. Hennecke, H.** 1990. Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. FEBS Lett. 268:422-426.
- 18. Hennecke. H., Fischer. H-M., Acuña. G., Anthamatten. D., Arigoni. F., Babst. M., Brouwer. P., Kaspas. T., Kullik. I., Preisig. O., Scherb. B, and Weidenhaupt. M.** 1993. Two Oxygen-responsive Regulatory cascades control Nitrogen Fixation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacios. et al. (eds.). Kluwer Academic Publishers.
- 19. Helinski. D., Agron. P, and Ditta. G.** 1993. Oxygen Regulation of *nifA* Transcription in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:3506-3510.

- 20. Hoover, T. R., Santero, E., Porter, S., and Kustu, S.** 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 63:11-22.
- 21. Huala, E., and Ausubel, F. M.** 1989. The central Domain of *Rhizobium meliloti* NifA is Sufficient to Activate Transcription from the *R. meliloti nifH* Promoter. *J. Bacteriology*. 171:3354-3365.
- 22. Kaluza, K., Hahn, M and Hennecke, H.** 1985. Repeated Sequences Similar to Insertion Elements Clustered Around the *nif* Region of the *Rhizobium japonicum* Genome. *Journal Bacteriology*. 162:535-542.
- 23. Kullik, I., Hennecke, H, and Fischer, H-M.** 1989. Inhibition of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-dependent *nif* gene activation occurs at the NifA protein level and is irreversible. *Arch. Microbiol.* 151:191-197.
- 24. Kullik, I., Fritsche, S., Knobel, H., Sanjuan, J., Hennecke, H, and Fischer, H-M.** 1991. *Bradyrhizobium japonicum* has two differentially regulated, functional homologs of the σ^{54} gene (*rpoN*). *J. Bacteriol.* 173:1125-1138.
- 25. Kustu, S., Santero, E., Popham, D, and Keener, J.** 1989. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* 53:367-376.
- 26. Kustu, S., North, A, and Weiss, D.** 1991. Prokaryotic Transcriptional enhancers and Enhancer-Binding Proteins. *TIBS.* 16:397-401.

- 27. Kustu, S., Weiss, D., Klose, K., Hoover, T., North, A., Porter, S., and Wedel, A.** 1992. Prokaryotic Transcriptional enhancers. *Transcriptional Regulation*. S. L. Mc Night and K. R. Yamamoto (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
- 28. Losick, R., Gross, C., and Lonetton, M.** 1992. Bacterial sigma factors. *Transcriptional Regulation*. S. L. Mc Night and K. R. Yamamoto (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 29. Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 30. Merrick, M.** 1992. Regulation of Nitrogen Fixation Genes in Free-Living and Symbiotic Bacteria. In *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., R. A. Burris, and H. J. Evans (eds.). Chapman and Hall, London.
- 31. Mora, J., and Lara, F.** 1988. Nitrogen Metabolism: An overview. p 1-20. In S. Sanchez-Esquivel (eds.), *Nitrogen Source control of Microbial Processes*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 32. Morett, E., and Buck, M.** 1988. NifA-dependent in vivo Protection Demonstrates that the Upstream Activator Sequence of nif Promoters is a Protein Binding Site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:9401-9405.
- 33. Morett, E., and Buck, M.** 1989. In vivo studies on the interaction of RNA polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters: The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* 210:65-77.

- 34. Morett. E., Fischer. H-M, and Hennecke. H.** 1991. Influence of Oxygen on DNA binding, Positive Control, and Stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA Regulatory Protein. J. Bacteriol. 173:3478-3487.
- 35. Morett. E., Olivera. L, and Hennecke. H.** 1993. Overlapping Promoters for two Polymerase Holoenzymes regulate Transcription of *nifA* in *Bradyrhizobium japonicum*. New Horizons In Nitrogen Fixation. R. Palacios et al.(eds.) Kluwer Academic Publishers.
- 36. Sanger. F., Nicklen. S, and Coulson. R.**1977. DNA Sequencing with chain-termination Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5463-5467.
- 37. Thöny. B., Fischer. H-M., Anthamatten. D., Bruderer. T, and Hennecke. H.** 1987. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. Nucl. Acids Res. 15:8479-8499.
- 38. Thöny. B., Anthamatten. D, and Hennecke. H.**1989. Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon *fixRnifA*: analysis of cis-and trans-acting elements. J. Bacteriol. 171:4162-4169.

APENDICE I**PSY****1 litro**

KH_2PO_4	0.3 gr
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.7 gr
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 gr
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 gr
Extracto de levadura	1 gr
Peptona de caseína	3 gr
Elementos traza	1 ml (Stock 1000X)
Vitaminas	1 ml (Stock 1000X)

Elementos traza**100ml (1000X)**

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4399 gr
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.077 gr
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.015 gr
$\text{NaMnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.024 gr
Na_3NO_4	2.1 mM
NaScO_3	0.5 mM

Vitaminas**100 ml (1000X)**

Riboflavina	2 gr
Biotina	1.2 gr
Thiamina-HCl	8 gr
Myo-Inositol	4.8 gr
P-Acido aminobenzoico	0.8 gr
Ac. Nicotínico	5 gr
Calcium Pantothenato	8 gr
Cyanocobalamina	10 ug

APENDICE II

Buffer fosfatos	1 litro 20X
NaCl	8.76 gr
K ₂ HPO ₄	6.96 gr
KH ₂ PO ₄	2.99 gr
Ajustar pH= 7.2	

APENDICE III

Buffer Z	100 ml
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	2.14 gr
NaH ₂ PO ₄ -4H ₂ O	0.55 gr
KCl	0.07
MgSO ₄	0.01 gr
2-Mercaptoetanol	349 ul

APENDICE IV

YEM	1 litro
Manitol	10 gr
Extracto de levadura	1 gr
Sol. A (Stock 100X)	10 ml
Sol. B (Stock 100X)	10 ml

Solución A. 100X

K ₂ HPO ₄	5 gr
NaCl	1 gr
H ₂ O	100 ml

Solución B. 100X

MgSO ₄	2 gr
H ₂ O	100 ml

APENDICE V**LA****1 litro**

Peptona de caseína	10 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr

Ajustar pH=7

APENDICE VI**GET****50 ml**

Glucosa	9.9 gr
EDTA	8.4 gr
Tris-Cl	7.88 gr

APENDICE VII**Acetato de Potasio****100 ml**

Acetato de K	60 ml 5M
Acético Glacial	11.5 ml
H ₂ O	28.5

APENDICE VIII**TAE****1 litro 50X**

Tris-base	242 gr
Acético glacial	51.1 ml
EDTA	100 ml 0.5 M pH=8
TAE 50X	2 ml en 98 ml de H ₂ O
Agarosa	1 gr

APENDICE IX

RIB (RNA Isolation Buffer)	200 ml		
NaAc	1.4 ml	3 M	pH=5
SDS	10 ml	10%	
EDTA	400 ul	0.5 M	pH=8
H ₂ O	188.2 ml		

APENDICE X

Rx Buffer 5X	
Tris-HCl	10mM pH=7.5
DIT	5 mM
BSA	0.5 mg/ml

APENDICE XI

Mn Buffer	
Isocitrato de Na ⁺	0.15 M
MnCl ₂	0.1 M

APENDICE XII

Solución stop	
Formamida	95%
EDTA	20 mM
Azul de bromo fenol	0.05%
Xylene cyanol	0.05%

APENDICE XIII

PAGE 6% (Poliacrilamida Gel Electroforesis)

Acrylamida-Bis 40%	9 ml
Urea	31.5 gr
TBE 5X	12 ml
H ₂ O	10 ml
APS 10%	360 ul
TEMED	60 ul
TBE 5X (Tris borato)	1 litro
Tris base	54 gr
Acido borico	27.5 gr
EDTA	20 ml 0.5M

APENDICE XIV

PNK (Poli nucleotido Kinasa) 10X

Tris-Cl	0.5 M pH=7.6
MgCl ₂	0.1 M
DIT	50 mM
Spermidina-HCl	1 mM
EDTA	1 mM pH=8

APENDICE XV

PAGE 15% (Poliacrilamida Gel Electroforesis)

Acrylamida-Bis 40%	22 ml
Urea	31.5 gr
TBE 5X	12 ml
APS 10%	360 ul
TEMED	60 ul

APENDICE XVI

Buffer A

Tris-Cl	0.1 M
Triethylamida	10mM
EDTA	1mM pH=7.7

TABLA DE GENES SUS PRODUCTOS O FUNCIONES CONOCIDAS

GENE	PRODUCTO O FUNCION CONOCIDA
<i>fbcH</i>	Citocromos b y c ₁
<i>fixA</i>	Subunidad del complejo de transferencia de electrones envuelto en la actividad de la nitrogenasa.
<i>fixB</i>	Subunidad del complejo de transferencia de electrones envuelto en la actividad de la nitrogenasa.
<i>fixC</i>	Subunidad del complejo de transferencia de electrones envuelto en la actividad de la nitrogenasa.
<i>fixJ</i>	Proteína activadora que responde a oxígeno.
<i>fixK</i>	Proteína que regula negativamente la expresión de NifA y relacionada con <i>Fnr</i> y <i>Crp</i> .
<i>fixL</i>	Fosfatasa sensora que responde a oxígeno.
<i>fixN</i>	Subunidad I de la oxidasa del citocromo c en bacteroides.
<i>fixR</i>	Posible oxidoreductasa dependiente de NAD.
<i>fixX</i>	Proteína del transporte de electrones como la ferredoxina.
<i>glnA</i>	Glutamino sintetasa I.
<i>glnB</i>	Proteína efectora tetramérica involucrada en la asimilación de nitrógeno.

<i>glnD</i>	Uridil transferasa involucrada en la asimilación de nitrógeno.
<i>groES₄</i>	Chaperonina 10.
<i>melA</i>	Tirosinasa requerida para la síntesis del pigmento melanina.
<i>nifA</i>	Proteína de regulación positiva de los genes <i>fix</i> y <i>nif</i> .
<i>nifD</i>	Subunidad α del componente I de la dinitrogenasa.
<i>nifE</i>	Proteína involucrada en la biosíntesis del cofactor de MoFe de la dinitrogenasa.
<i>nifH</i>	Componente II de la dinitrogenasa.
<i>nifK</i>	Subunidad β del componente I de la dinitrogenasa.
<i>nifL</i>	Proteína de regulación negativa sobre <i>NifA</i> que responde a oxígeno.
<i>nifN</i>	Proteína involucrada en la biosíntesis del cofactor de MoFe de la dinitrogenasa.
<i>ntrA</i>	Factor sigma 54 (<i>rpoN</i>).
<i>ntrB</i>	Fosfatasa sensora del sistema de regulación para la asimilación de nitrógeno.
<i>ntrC</i>	Proteína activadora del sistema de regulación para la asimilación de nitrógeno.
<i>rpoN</i>	Factor sigma 54.