

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA MUTANTE LM01 DE
Rhizobium etli QUE SE ENCUENTRA ALTERADA
EN LA DEGRADACIÓN DE GLUTAMATO Y
GLUTAMINA, Y EN SU RELACIÓN SIMBIÓTICA
CON *Phaseolus vulgaris*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA EL Q.F.B

ARTURO CALDERÓN FLORES

México, D.F.

2005

m 347782



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Pienso a veces que ha llegado la hora de callar.
Dejar a un lado las palabras,
las pobres palabras usadas
hasta sus últimas cuerdas,
vejadas una y otra vez
hasta haber perdido
el mas leve signo
de su original intención de nombrar las cosas,
[...]

[...]
Pienso a veces que ha llegado la hora de callar,
pero el silencio sería entonces
un premio desmedido,
una gracia inefable
que no creo haber ganado todavía.

Álvaro Mutis

Dedicatoria.

Dedico esta tesis a la UNAM

Me gustaría escuchar del Dr. Jorge Calderón Jiménez aquello de: “Ya estás hecho”; sin embargo, luego de tanto tiempo las circunstancias sólo me permiten dedicarle esta tesis *in memoriam*.

A Jesús Calderón (mi papá) que me enseñó a trabajar y me mostró el extremo de solo pensar.

A Rosa Flores (mi mamá) que me crió y me mostró el extremo de solo sentir.

A mis hermanos: Jesús, Ricardo, Enrique, Héctor, Octavio y Rosa María; todos tan diferentes.

Durante mis estudios de doctorado recibí una beca de la Dirección de Estudios de Posgrado de la UNAM y apoyo del programa PAEP, también de la UNAM.

Agradecimientos.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial: Dra. Socorro Durán Vargas, Dra. Imelda López Villaseñor y Dr. David Romero Camarena las enseñanzas, la ayuda y la comprensión por mi partida y retorno.

A Gisela Du Pont por su enseñanza de trabajo en el laboratorio.

A Jorge, Alejandro, Daniel, y Lloret, que hacían divertido estar en el laboratorio.

A Pickles, con quien solía platicar y comunicarme.

A mis compañeros de laboratorio: Gisela, Osvaldo, Soco, Alejandra, Karen, Andrea, Toño, Jaime, Martha, Raúl y Victor.

A Lorena, Norma, Naima, Yuriria, Salomón, Gisela, Paco, Elia, Jefe Bastarrachea, Chucho, Poggio e Itzel que habitan o habitaban Biomédicas.

A la Dra. Lourdes Girard por los plásmidos para medir la actividad de los genes *fix*, y por el espacio en su laboratorio.

RESUMEN

El metabolismo de aminoácidos ha demostrado ser importante durante la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno en las bacterias del género *Rhizobium*. Por ello se aisló una mutante de *R. etli* incapaz de utilizar varios de ellos como fuente de nitrógeno o de carbono-nitrógeno. El gen interrumpido en la mutante LM01 mostró alta similitud a los genes *relA* y *spoT*, responsables de la respuesta estricta en bacterias. La respuesta estricta es un sistema para adaptar el metabolismo bacteriano a la limitación de aminoácidos y de fuente de carbono, y está mediado por la síntesis de polifosfatos de guanosina o (p)ppGpp. El gen de la respuesta estricta de *R. etli* se denominó *rsh* (homólogo de *rel* y *spo*) y codifica para una proteína de 744 aminoácidos; como la inserción del Tn5 en la mutante LM01 permite la síntesis de una proteína truncada de 329 aminoácidos, se obtuvo la mutante AC1 que permite la síntesis de una proteína Rsh truncada de 98 aa. Análisis de complementación de las mutantes AC1 y LM01 de *R. etli*, así como de mutantes en los genes *relA* y *spoT* de *Escherichia coli* mostraron que la proteína truncada Rsh de 329 aa de *R. etli* conserva su capacidad de hidrólisis de (p)ppGpp; mientras que la proteína truncada Rsh de 98 aa no presenta actividad de síntesis, ni de degradación de (p)ppGpp. Las mutantes AC1 y LM01 expresaron constitutivamente los genes *nod*, pero nodularon menos que la cepa silvestre y no presentaron actividad de fijación de nitrógeno. Los nódulos formados por la mutante LM01 contienen bacteroides, pero a diferencia de los silvestres, estos son pleiomórficos y no presentan gránulos de poli- β -hidroxibutirato. Se discuten las implicaciones de la respuesta estricta en el metabolismo y la relación simbiótica de *R. etli*.

Abstract

The amino acid metabolism has shown to be important for nodule formation and nitrogen fixation in rhizobia. The LM01 mutant of *Rhizobium etli* was selected by its inability to grow with glutamine as carbon and nitrogen source, the LM01 mutant was also affected in the capacity to use other amino acids either as nitrogen or carbon sources. The interrupted gene in the LM01 mutant showed high similarity to the *relA* and *spoT* genes which code for the stringent response proteins in bacteria. The stringent response is a system that allows bacteria to overcome amino acid and carbon starvation; stringent response is mediated by the synthesis of guanosine polyphosphates or (p)ppGpp. *R. etli rsh* (*rel spo* homolog) gene codes for a 744 aa protein; as the Tn5 insertion event in the LM01 allows the synthesis of a truncated Rsh protein of 329 aa, a second mutant, AC1, was constructed to allow the synthesis of a Rsh 98 aa polypeptide. Complementation experiments with the LM01 and AC1 *R. etli* mutants, as well as with mutants of the stringent response in *Escherichia coli* showed that the truncated Rsh protein in LM01 mutant conserved (p)ppGpp hydrolase activity. For other hand, the 98 aa Rsh truncated protein did not show any (p)ppGpp synthetic or hydrolytic activity. LM01 and AC1 mutants expressed constitutively the *nodA* gene, but had a reduced ability for nodulation, nodules elicited by the mutants did not fix nitrogen. Electronic micrographs of LM01 nodules showed that they possess bacteroids, but that bacteroids lacked poly- β -hydroxybutyrate granules. Implications of stringent response for the *R. etli* free living state and for its symbiosis with bean plants are discussed.

INDICE

Introducción

I)	Interacción simbiótica entre <i>Rhizobium</i> y las plantas leguminosas.....	8
	Rizósfera y comunicación bacteria-planta.....	10
	Factores de nodulación.....	12
	Colonización de las plantas.....	13
	Genes para la fijación de nitrógeno.....	16
	Intercambio metabólico planta-bacteria, adaptaciones metabólicas de las bacterias en los nódulos.....	16
	Asimilación de amonio y metabolismo de los aminoácidos en los bacteroides.....	20
	El control del metabolismo durante la diferenciación de los bacteroides	25
	Síntesis de polímeros de carbono en los bacteroides.....	29
I)	La respuesta estricta en bacterias.....	31
	La respuesta estricta en <i>Escherichia coli</i>	33
	El gen <i>relA</i> de <i>Escherichia coli</i>	34
	El gen <i>spoT</i>	34
	Las secuencias de RelA y SpoT están interrelacionadas.....	36
	El dominio HD.....	36
	Otros genes de la respuesta estricta.....	37
	El gen <i>relC</i> o <i>rplK</i>	37
	El gen <i>gpp</i>	37
	Los genes <i>rpoBCD</i>	38
	La síntesis de (p)ppGpp dependiente de ribosomas.....	40
	Control de la síntesis de ribosomas.....	42
	Síntesis de proteínas durante la respuesta estricta.....	44
	Los genes de la respuesta estricta en otras bacterias y organismos.....	44
	Estructura cristalográfica de una proteína Rsh.....	47
II)	La respuesta estricta y el metabolismo en bacterias.....	49
	Factor sigma de estado estacionario.....	49
	Resistencia a antibióticos y respuesta estricta.....	50
	Producción de metabolitos secundarios.....	51

Caracterización de la respuesta estricta en algunas bacterias:	
<i>Streptococcus equisimilis</i>	51
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	52
<i>Vibrio sp.</i>	53
<i>Bacillus subtilis</i>	53
<i>Campylobacter jejuni</i>	54
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	55
<i>Myxococcus xanthus</i>	55
La respuesta estricta en el género <i>Rhizobium</i>	57
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	57
Justificación	59
Objetivo general	62
Objetivos particulares	62
Hipótesis	62
Resultados	
Artículo.....	63
Resultados adicionales	64
Discusión	
La estrategia de selección de la mutante LM01 y la clonación del gen <i>rsh</i>	65
La síntesis de (p)ppGpp en <i>R. etli</i>	67
La utilización de aminoácidos por las mutantes LM01 y AC1 de <i>R. etli</i>	68
La proteína Rsh de <i>R. etli</i>	69
El problema de la reducción de la nodulación y la fijación de nitrógeno en las mutantes AC1 y LM01.....	71
El estudio de la expresión genética en las mutantes de la respuesta estricta.....	74
Perspectivas	75
Bibliografía	78

INTRODUCCIÓN

Esta introducción tiene tres secciones que presentan una visión general de la información relacionada con los resultados del proyecto. La naturaleza de los temas expuestos genera una discontinuidad entre los temas I y II.

I) Generalidades de la interacción simbiótica entre las bacterias del grupo *Rhizobium* y las plantas de la familia *Leguminosae*, enfocada a las bacterias y su metabolismo carbono-nitrógeno durante la simbiosis.

II) Una visión general de la respuesta estricta en bacterias.

III) Mención de algunos reportes que ligan a la respuesta estricta a fenómenos bacterianos como el metabolismo, la formación de estructuras sociales, la utilización de fuentes alternativas de alimento, la persistencia en ambientes, los procesos de infección, etc.

I) INTERACCIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *Rhizobium* Y PLANTAS LEGUMINOSAS

La asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosas es un modelo biológico complejo. De él se pueden estudiar entre muchos aspectos: la comunicación celular entre dos organismos tan diferentes como una planta y una bacteria, la colaboración de esos organismos para formar una estructura especial (el nódulo), la plasticidad genética necesaria para la interacción, y la adaptación metabólica que efectúan ambos miembros de la asociación para satisfacer los requerimientos de nitrógeno de la planta y los requerimientos de carbono de las bacterias (Mylona *et al.*, 1995). El hecho de que muchas de las leguminosas que establecen interacciones con *Rhizobium* sean cultivadas para obtener alimentos, suma objetivos de carácter socioeconómico al estudio de la interacción.

Las bacterias denominadas en conjunto *Rhizobium* o rizobios, de los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium*, son capaces de interactuar en condiciones de limitación de nitrógeno con plantas de la familia *Leguminosae* para formar una simbiosis que tiene como objetivo fijar nitrógeno atmosférico (Brewin, 1991; Mylona *et al.*, 1995; Schultze y Kondorosi, 1998; Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). La simbiosis entre estos dos grupos de organismos se establece en la mayoría de los casos en las raíces de las plantas, en las que se forman nódulos que alojan a las bacterias (Mylona *et al.*, 1995; Schultze y Kondorosi, 1998). Dentro de los nódulos, las bacterias se especializan como fijadoras de nitrógeno o bacteroides, adaptando su metabolismo para reducir nitrógeno atmosférico y exportarlo a la planta (Mylona *et al.*, 1995). Dentro de los nódulos la concentración de oxígeno libre se disminuye mediante la proteína vegetal leghemoglobina, lo cual impide que la enzima que reduce al nitrógeno atmosférico (nitrogenasa) se inactive con las concentraciones atmosféricas de oxígeno (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). La reducción de la concentración de oxígeno en el nódulo sirve como señal para el inicio de la transcripción de los genes estructurales de la nitrogenasa y de algunos otros como los citocromos necesarios para su actividad (Preisig *et al.*, 1993).

Durante la formación del nódulo las bacterias experimentan una adaptación sucesiva a tres ambientes:

- 1) La zona radicular de la planta (rizósfera) en donde las bacterias y la planta establecen comunicación química;
- 2) Los hilos de infección, que son las estructuras por donde las bacterias comienzan la colonización de las raíces de la planta, y:
- 3) El citoplasma de las células vegetales, al cual las bacterias son endocitadas.

La adaptación y especialización de bacteria a bacteroide incluye la modificación del metabolismo y la forma de la bacteria, además de la pérdida de la capacidad de división celular (Mylona *et al.*, 1995; Schultze y Kondorosi, 1998).

Rizósfera y comunicación bacteria-planta

En la periferia de las raíces de las plantas (rizósfera) se encuentran muchos elementos nutritivos, (entre ellos: ácidos dicarboxílicos, vitaminas y aminoácidos) (Mylona *et al.*, 1995). Diversos grupos de microorganismos hacen uso de esos nutrientes para crecer, por lo que la rizósfera es un ambiente con una alta concentración y diversidad de microorganismos. Las raíces de las leguminosas exudan además un grupo de compuestos que pertenecen a la familia química de los flavonoides (flavonoides, isoflavonoides y flavononas) (Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Kape *et al.*, 1991). Los rhizobios presentan quimiotaxis y utilizan a dichos compuestos como señal de inicio de la interacción simbiótica (Maxwell *et al.*, 1989; Mulligan y Long, 1985; Rélic *et al.*, 1994; Schultze y Kondorosi, 1998).

Las bacterias del género *Rhizobium* tienen una proteína específica para interactuar con los flavonoides, la proteína NodD está localizada en la membrana citoplasmática, en donde se une a un tipo específico de flavonoide (Peters *et al.*, 1986; Schlaman *et al.*, 1989). La transferencia de un gen *nodD* de una especie o cepa a otra, generalmente transfiere la capacidad de interactuar con el mismo flavonoide al que responde la cepa original (Horvath *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1987). Las proteínas NodD pertenecen a la familia de proteínas LysR y una vez que son activadas por la unión al flavonoide, regulan la expresión de un grupo de genes que por estar involucrados en la nodulación se conocen como genes de la nodulación o genes *nod* (Mulligan y Long, 1985; Phillips *et al.*, 1992; Spaink *et al.*, 1987). La transcripción de los

genes *nod* se activa cuando la proteína NodD activada se une a la llamada caja *nod* en la región promotora de dichos genes (Mulligan y Long, 1989; Wang y Stacey, 1991).

Algunas especies de *Rhizobium* tienen varias proteínas que en conjunto regulan la expresión de los genes *nod* en respuesta a diferentes estímulos ambientales y de las plantas (Kondorosi *et al.*, 1991; Maxwell *et al.*, 1989; Mulligan y Long, 1985; Peters *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1993). Esas proteínas participan de otros circuitos de regulación como el caso del gen *syrM* (de la familia LysR) que regula la síntesis de los polisacáridos extracelulares necesarios para la formación correcta de los hilos de infección de los nódulos (Barnett *et al.*, 1998; Dusha *et al.*, 1996; Hanin *et al.*, 1998; Mulligan y Long, 1989). Se ha sugerido que en *S. meliloti* los genes *syrM* y *nodD3* pueden regular la síntesis de los factores de nodulación en respuesta al estado fisiológico y de desarrollo de las bacterias y bacteroides en formación, debido a que son expresados en forma espacio-temporal (Kondorosi *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1993).

También las condiciones fisiológicas de la bacteria afectan la expresión de los genes *nod*; la presencia de ácidos dicarboxílicos inhibe la expresión de los genes *nod* en *B. japonicum* (Yuen y Stacey, 1996). Las proteínas NodD3 de *S. meliloti* y NodD1 de *B. japonicum* están involucradas en la represión del regulón *nod* por nitrógeno asimilable (Dusha *et al.*, 1989; Dusha y Kondorosi, 1993; Wang y Stacey, 1991;). En *R. etli*, el incremento de la capacidad de asimilación de amonio debida a la expresión de la enzima glutamato deshidrogenasa de *E. coli*, inhibe la expresión de los genes *nod* y la síntesis de los factores de nodulación, de forma dependiente del sistema de regulación del metabolismo de nitrógeno, a través de la proteína NtrC (Mendoza *et al.*, 1995).

Factores de nodulación

Las proteínas codificadas por los genes *nod* se encargan de producir una señal química que provoca una respuesta en su tejido blanco, ubicado en las raíces de plantas; dicha respuesta es el inicio de los cambios necesarios para la formación de los nódulos (Day *et al.*, 2000; Denarié *et al.*, 1996; Rélic *et al.*, 1994). Los factores de nodulación (Nod) son oligómeros de 3 a 5 unidades de N-acetil glucosamina con enlaces β -1, 4. Las unidades de N-acetil glucosamina están sustituidas con diversos grupos funcionales (acetilo, sulfato, fucosil etc.) que varían según la especie bacteriana (Baev *et al.*, 1991; Horvart *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1991). Los genes *nod* se clasifican en dos grupos de acuerdo a su papel en la síntesis de los factores de nodulación: los genes *nod* comunes (*nodABC*) codifican proteínas que sintetizan la estructura principal del factor de nodulación (Spaink *et al.*, 1991), mientras los genes *nod* especie específicos (*nodMNLOPQ* etc.), codifican proteínas encargadas de añadir grupos funcionales a la estructura principal de los factores de nodulación (Fernández-López *et al.*, 1998). Los grupos funcionales en los factores Nod son determinantes en la interacción con las distintas especies o variedades de plantas (Rélic *et al.*, 1994). Todas las mutantes en los genes *nodABC* son Nod⁻ (no nodulan), mientras que las mutantes en otros genes *nod* muestran diversos fenotipos, dependiendo de la interacción planta-bacteria a prueba (Debellé *et al.*, 2001; Göttfert *et al.*, 1990; Horvart *et al.*, 1987). Si bien los factores Nod son indispensables para iniciar la interacción simbiótica, una sobreproducción de ellos provoca la reducción de la capacidad de nodulación (Knight *et al.*, 1986).

Los factores de nodulación, a concentraciones en el intervalo pico a nano molar, provocan el crecimiento de pelos radiculares en plantas susceptibles (Denarié *et al.*, 1996); y son capaces de provocar en algunas plantas la formación de estructuras de preinfección y

pseudonódulos en ausencia de bacterias (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Para iniciar una interacción bacteria- planta, se requiere que la bacteria responda a alguno de los flavonoides que la planta exuda y que la planta responda a alguno de los factores o al factor de nodulación producido por la bacteria (Long, 1989).

Colonización de las plantas

La colonización de las leguminosas por los *Rhizobium* comprende diferentes rutas, dependiendo de la planta y la bacteria que interactúen, la ruta más simple es la entrada de las bacterias a través de aberturas entre las células vegetales o la formación de pequeñas acumulaciones bacterianas en las raíces (Mylona *et al.*, 1995). Pero las interacciones más estudiadas se dan por mecanismos programados para la entrada de las bacterias y la formación de los nódulos (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Una vez que los factores de nodulación curvan a los pelos radiculares, las bacterias se acumulan en la cara interior de esas curvaturas y se presenta un proceso de hidrólisis local de las paredes de las células vegetales en la región deformada, la membrana plasmática sufre invaginación y una nueva pared se deposita formando una estructura tubular por la cual las bacterias entran en la planta, esto se constituirá en el hilo de infección (Brewin, 1991). Durante el crecimiento en los hilos de infección, las bacterias forman filas; algunas de las bacterias son endocitadas por las células vegetales rodeadas por una membrana que se convertirá en la membrana peribacteroidal (Mylona *et al.*, 1995). La membrana que rodea a los bacteroides tiene la “cara extracelular” orientada hacia los bacteroides, mientras que la “cara intracelular” está orientada hacia el citoplasma de las células vegetales (Mylona *et al.*, 1995; Day *et al.*, 2001). La membrana peribacteroidal es diferente a otras membranas en la planta colonizada, pues contiene proteínas específicas de nódulo (Long, 1989). La membrana peribacteroidal tiene un papel central en la interacción

simbiótica, ya que a través de ella se dan los intercambios metabólicos que sustentan dicha relación (Brewin, 1991; Day *et al.*, 2001).

Dentro de las células invadidas, las bacterias se dividen pocas veces y se especializan a bacteroides fijadores de nitrógeno (Mylona *et al.*, 1995). A la membrana peribacteroidal, a los bacteroides, al espacio entre ellos y la membrana peribacteroidal también se les conoce como simbiosomas (Roth *et al.*, 1988). Cuando se utiliza el nombre simbiosoma, la membrana peribacteroidal se denomina membrana del simbiosoma (Roth *et al.*, 1988).

Dependiendo de su forma, los nódulos simbióticos se agrupan en dos tipos: aquellos que se forman de interacciones como las de las plantas de alfalfa y bacterias de la especie *S. meliloti*, tienen un primordio que nunca deja de dividirse y se conocen como indeterminados (Brewin, 1991). Como resultado del tipo de primordio, los nódulos indeterminados presentan forma cilíndrica; en estos nódulos los bacteroides están rodeados individualmente por la membrana peribacteroidal. Con el crecimiento del primordio de los nódulos indeterminados, se continúan los procesos de infección celular y de maduración de bacteroides (Brewin, 1991), por lo que dentro de ellos se pueden encontrar en cualquier momento desde bacterias creciendo en los hilos de infección hasta bacteroides que están por fenecer. Las zonas de estos nódulos indeterminados se definieron con estudios de microscopía (Brewin, 1991):

La zona I comprende a las bacterias creciendo en los pelos de infección

La zona II es la zona en la que se lleva a cabo la colonización de las células vegetales, y el inicio de la diferenciación de los bacteroides.

La zona III es la zona en la que los bacteroides ya están maduros y fijando nitrógeno.

Por otra parte, los nódulos formados por interacciones como las de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) con bacterias de la especie *R. etli*, tienen estructura globular y son

conocidos como nódulos determinados, en este tipo de nódulos hay varios bacteroides rodeados por una misma membrana peribacteroidal (Brewin, 1991); su formación es el resultado del crecimiento celular a partir de un solo primordio que deja de crecer (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995). Los bacteroides contenidos en los nódulos determinados se consideraban en el mismo estadio de desarrollo (Calvert *et al.*, 1984; Newcomb *et al.*, 1979; Selker, 1988). Sin embargo, un estudio microscópico más detallado de la interacción *R. etli-P. vulgaris*, permitió conocer que los nódulos a los 12 días tienen bacteroides en varios estadios de desarrollo (Cermola *et al.*, 2000). La invasión de los nódulos determinados se lleva a cabo a través de hilos de infección, siendo las primeras células vegetales invadidas las del tejido central del nódulo y luego las células circundantes. Es posible que en este tipo de nódulos exista además una colonización desde células adyacentes (Cermola *et al.*, 2000). También en ese estudio se observó que las membranas de los simbiosomas se fusionan haciendo que mayor número de bacteroides estén en cada simbiosoma; esta fusión se hace más frecuente en los bacteroides que no fijan nitrógeno y en los nódulos viejos, lo que podría considerarse una forma de reducir el intercambio metabólico y acelerar el envejecimiento de los bacteroides (Cermola *et al.*, 2000). Con estudios de expresión genética en bacteroides de nódulos determinados se descubrió que los bacteroides presentan un patrón de expresión genética distinto dependiendo de su posición en un mismo nódulo (Patriarca *et al.*, 1996; Taté *et al.*, 1994), lo cual es más congruente con un esquema de varios eventos de colonización que con un solo evento de colonización sincronizada (Cermola *et al.*, 2000).

Existen propuestas de que los bacteroides están estresados dentro de las células vegetales (Brewin, 1991) debido a su reducida velocidad de crecimiento y limitado metabolismo general; la presencia de bacteroides estresados facilitaría el control del decaimiento de los

nódulos que no son capaces de fijar; pues si la planta les elimina el aporte energético, su viabilidad podría ser reducida en poco tiempo.

Genes para la fijación de nitrógeno

Los genes que están directamente involucrados en la fijación de nitrógeno se agrupan de acuerdo a si son homólogos o no de los genes para la fijación de nitrógeno de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*; aquellos homólogos se denominan *nif*, mientras que los que no lo son, se denominan *fix* (Fischer, 1994). Los genes *nifHDK* codifican para el complejo proteico denominado nitrogenasa, mientras que entre los genes *fix* podemos encontrar a *fixNOQP* que codifican para una citocromo oxidasa C con alta afinidad por oxígeno (Preisig *et al.*, 1993).

La fijación de nitrógeno es un proceso altamente regulado. Para la mayoría de las especies de *Rhizobium* se han descrito dos cascadas de regulación de los genes de la fijación de nitrógeno: las cascadas FixL-FixJ-FixK y NifA-RpoN. La primera cascada de regulación se activa a bajas concentraciones de oxígeno, que el sistema de dos componentes FixL-FixJ se encarga de sensar (David *et al.*, 1988, Fischer *et al.*, 1986); mientras que la segunda cascada utiliza al activador transcripcional NifA y al factor alternativo sigma 54 de la RNA polimerasa (Fischer, 1994). Se ha reportado que las cascadas de regulación descritas presentan particularidades en diferentes especies (David *et al.*, 1988; Girard *et al.*, 2000).

Intercambio metabólico planta-bacteria, adaptaciones metabólicas de las bacterias en los nódulos

Las bacterias capaces de fijar nitrógeno en vida libre sensan la disponibilidad de nitrógeno asimilable con el sistema de regulación de nitrógeno (sistema ntr), cuando las células están limitadas de nitrógeno adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones e inician la fijación de nitrógeno. Las adaptaciones incluyen la expresión del sistema de la nitrogenasa para fijar

nitrógeno, la expresión de un sistema con alta capacidad para asimilar amonio y la expresión de un sistema para reducir la concentración de oxígeno en las células. Existen diversas estrategias para reducir la concentración de oxígeno que incluyen: el funcionamiento de una cadena alternativa de respiración, la especialización celular en colonias bacterianas y la formación de estructuras pluricelulares que forman una barrera entre el oxígeno ambiental y las células que expresan a la nitrogenasa.

Por su parte, las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis efectúan una complicada serie de cambios que deben coordinarse con aquellos efectuados por la planta que las hospeda. El intercambio metabólico establecido entre la planta y los bacteroides es el objetivo primordial de la formación de la simbiosis, por lo tanto, las adaptaciones para lograr dicho intercambio son indispensables para formar una simbiosis productiva.

Históricamente se dio mayor importancia al estudio de la fuente de energía utilizada por los bacteroides mientras realizan la actividad de fijación de nitrógeno, pues esa energía se utiliza primordialmente para la fijación de nitrógeno. En diversos estudios se encontró que durante la fijación de nitrógeno los ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos: succinato, fumarato y malato proporcionan los requerimientos de energía y carbono a los bacteroides (Engelke *et al.*, 1989; Van Slooten *et al.*, 1992; Yarosh *et al.*, 1989). Apoyando el esquema anterior, se demostró que bacterias mutantes del transportador de ácidos dicarboxílicos (*dctA*), forman nódulos con bacteroides bien diferenciados pero inefectivos (no fijan nitrógeno) que fenecen pronto. El sistema de transporte de los ácidos dicarboxílicos (*dct*) consta de los genes *dctABD*: El gen *dctA* codifica para una permeasa de alta afinidad por ácidos dicarboxílicos (Engelke *et al.*, 1989; Finan *et al.*, 1981; Yarosh *et al.*, 1989), mientras que los genes *dctBD* codifican para un sistema de regulación de dos componentes (Giblin *et al.*, 1995). En el sistema de dos

componentes la proteína DctB tiene capacidad de autofosforilarse cuando están presentes sus inductores (ácidos dicarboxílicos y el aminoácido aspartato), una vez fosforilada tiene actividad de cinasa y fosforila a la proteína DctD, que entonces funciona como activador transcripcional del gen *dctA* de manera dependiente del factor sigma 54 de la RNA polimerasa (Giblin *et al.*, 1995; Ledebur *et al.*, 1992). La evidencia genética de que el transporte de dicarboxilatos en los *Rhizobium* es indispensable para la simbiosis, correlaciona con la presencia de un transportador para dicarboxilatos en la membrana del simbiosoma (Day *et al.*, 2001).

Los genes *dctBD* son necesarios en vida libre para la activación del gen *dctA*, por lo tanto, para la utilización de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos. Sin embargo, en simbiosis, las mutantes en los genes *dctBD* fijan nitrógeno a una velocidad similar a las cepas silvestres (Engelke *et al.*, 1989; Jiang *et al.*, 1989; Watson 1990; Wang *et al.*, 1989; Yarosh *et al.*, 1989), lo que implica que además de *dctBD*, otro sistema o elemento permite la expresión del gen *dctA*.

La expresión del gen *dctA* de *S. meliloti* se estudió de manera espacio temporal durante su simbiosis con plantas de alfalfa mediante fusiones transcripcionales *dctA-lacZ* en la cepa silvestre y en una mutante *dctBC*. En los primeros estadios de la colonización (hilos de infección) la actividad del gen reportero es muy baja en ambas cepas, pero se detecta actividad tan pronto como las bacterias son endocitadas por las células vegetales, lo cual implica que fuentes de carbono distintas a los dicarboxilatos son utilizadas por las bacterias mientras crecen en los hilos de infección. En la zona de prediferenciación (zona II) existe una expresión reducida de la fusión en la cepa silvestre, pero no en la mutante *dctBC*; en esta zona las mutantes en transporte de dicarboxilatos crecen como las cepas silvestres, lo que sugiere que

en esta zona se utiliza una mezcla de fuentes de carbono (Boesten *et al.*, 1998; Patriarca *et al.*, 2002). En la interfase de las zonas II y III y en la zona III de los nódulos, las mutantes *dctBD* expresan actividad de β -galactosidasa de la fusión *dctA-lacZ*; claramente la expresión es independiente de DctBD, pero se demostró que es dependiente del factor sigma 54 de la RNA polimerasa. Este resultado indica que en esta etapa los bacteroides obtienen energía o carbono esencialmente de dicarboxilatos y que los bacteroides experimentan un cambio en la fuente de energía o carbono al ser endocitados por las células vegetales (Patriarca *et al.*, 2002).

Si las bacterias que no pueden transportar ácidos dicarboxílicos (*dctA*) son capaces de crecer en los hilos de infección e incluso comenzar su diferenciación a bacteroides, otras fuentes de alimento deben ser accesibles en ese estadio de desarrollo para los bacteroides. Como las cepas de *Rhizobium* auxótrofas a aminoácidos pueden crecer en los hilos de infección, se puede inferir que los aminoácidos están presentes en esa estructura (Patriarca *et al.*, 2002). Se considera que los aminoácidos presentes en el hilo de infección provienen de la hidrólisis de las células vegetales durante el crecimiento de la estructura (Patriarca *et al.*, 2002). Es interesante, por otra parte, el hecho de que las cepas auxótrofas no sintetizan factores de nodulación hasta que los aminoácidos que requieren se adicionan al medio de cultivo (Ferraioli *et al.*, 2002).

En la simbiosis entre *R. etli* y las plantas de frijol, exceptuando a los aminoácidos arginina y metionina, los demás parecen ser accesibles en los hilos de infección, pues cepas auxótrofas a ellos llegan a ser endocitadas por las células vegetales (Ferraioli *et al.*, 2002). El hecho de que las cepas auxótrofas crezcan en su trayecto a través del hilo de infección no es sinónimo de que la simbiosis sea efectiva, pues los nódulos de las cepas auxótrofas se forman a velocidades diferentes que los de las correspondientes cepas silvestres, y no siempre logran

colonizar a las células vegetales de la misma forma que aquellos. Además, generalmente presentan actividad reducida de fijación de nitrógeno (Castillo *et al.*, 2000; Ferraioli *et al.*, 2001; Taté *et al.*, 1997; Taté *et al.*, 1999b;). En *S. meliloti* las cepas auxótrofas de isoleucina-valina no forman nódulos, pero otras cepas auxótrofas pueden establecer la relación simbiótica (Aguilar y Grasso, 1991; Barsomian *et al.*, 1992; Kerppola y Kahn, 1988; Prasad *et al.*, 2000; Truchet *et al.*, 1980). De los estudios del transporte de dicarboxilatos y las cepas auxótrofas de aminoácidos se puede concluir esencialmente que: los aminoácidos alimentan a las bacterias en los hilos de infección, mientras que los dicarboxilatos proveen energía a los bacteroides durante la fijación de nitrógeno (Patriarca *et al.*, 2002).

Asimilación de amonio y metabolismo de aminoácidos en los bacteroides

Un aspecto sobresaliente del comportamiento de los bacteroides dentro de los nódulos, es que fijan nitrógeno que no utilizan para sí mismos. Por eso se ha estudiado la asimilación de amonio, su regulación y otras vías que se relacionan con ella.

Los *Rhizobium* asimilan amonio por la vía de glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). Los bacteroides por su parte, presentan niveles bajos de las enzimas de asimilación de amonio y aparentemente estas no tienen un papel importante en la simbiosis (Lodwig y Poole, 2003; Patriarca *et al.*, 2002). Se han caracterizado mutantes que carecen de actividad de GS de varias especies, en el caso de *S. meliloti* ninguna de la isozimas de GS es necesaria para la fijación de nitrógeno (de Bruijn *et al.*, 1989). Mientras que las mutantes de *B. japonicum* en las enzimas de asimilación de amonio no nodulan ni fijan nitrógeno (Carlson *et al.*, 1987; Espín *et al.*, 1994; Merrick y Edwards, 1995; Shatters *et al.*, 1993). Algunos autores interpretan los resultados considerando que los casos en que la asimilación de amonio lleva a una simbiosis defectuosa, se deben a que la planta no proporciona los aminoácidos glutamina

o glutamato para los que las mutantes son auxótrofas (Patriarca *et al.*, 2002). De ser ese el caso, las proteínas de asimilación de amonio tendrían un papel activo en el inicio de la interacción, siendo dispensables para el resto del proceso de formación de los nódulos y de los bacteroides (Patriarca *et al.*, 2002).

Un reporte de la caracterización de una mutante de *R. etli* en los genes *glbBD*, que codifican para la enzima GOGAT, indica que esa vía podría tener un papel activo en el intercambio metabólico (Castillo *et al.*, 2000). La mutante sintetiza una menor cantidad de compuestos nitrogenados que la cepa silvestre, observándose un mayor gasto de energía para la fijación de nitrógeno y un menor gasto en la síntesis de aminoácidos (Castillo *et al.*, 2000). Sin embargo, en un estudio independiente que describe cepas auxótrofas a aminoácidos, se reporta que otra mutante de *R. etli* sin actividad de GOGAT, lejos de aumentar el intercambio de nitrógeno con las plantas, nunca alcanza los niveles de nodulación y fijación de nitrógeno de la cepa silvestre (Ferraioli *et al.*, 2002). Contradicción que los autores del segundo trabajo no discuten, si bien trabajaron con el mismo fondo genético.

A pesar de las bajas actividades de las enzimas de asimilación de amonio, los bacteroides acumulan aminoácidos marcados cuando se incuban con $^{14}\text{CO}_2$, entre ellos, los aminoácidos frecuentemente encontrados son la alanina, el aspartato y el glutamato (Bergensen y Turner, 1993; Kouchi *et al.*, 1991; Salminen y Streeter, 1992). Otros bacteroides como los de *R. etli* acumulan glutamato (Mendoza *et al.*, 1998). Esos datos indican que el metabolismo de los aminoácidos puede tener un papel importante en la simbiosis.

Se ha propuesto que la síntesis de glutamato en bacteroides de soya y de alfalfa es consecuencia de reducción de la actividad de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa debida a la microaerobiosis que impera en los nódulos (Patriarca *et al.* 2002). Por otra parte, la velocidad

de degradación de ese aminoácido es muy lenta; lo cual sugiere que su síntesis no es importante para la relación simbiótica (Patriarca *et al.*, 2002).

El hecho de que los bacteroides de las plantas de chícharo aislados y puestos en condiciones de fijación de nitrógeno sinteticen alanina en un medio en el que el amonio fijado se deja concentrar, condujo a la afirmación de que el amonio primero se combina para formar alanina y después se transporta a la planta (Waters *et al.*, 1998). No obstante, en experimentos en los que se impide que el amonio se acumule -como puede esperarse suceda *in vivo*-, la alanina se sintetiza en muy bajas concentraciones (Allaway *et al.*, 2000). La alanina deshidrogenasa (*adh*) es la enzima que contribuye mayoritariamente a la síntesis de la alanina en *Rhizobium leguminosarum* (Allaway *et al.*, 2000), si la alanina constituyera la forma principal de transporte del nitrógeno fijado, la mutación de esta enzima debiera tener consecuencias graves para la relación simbiótica. Los experimentos muestran que los bacteroides de las mutantes en *adh* no pueden sintetizar alanina, pero nodulan y fijan a niveles parecidos a los de la cepa silvestre, si bien a las seis semanas de edad, las plantas inoculadas con la mutante tienen una reducción del 20 % en el peso seco (Allaway *et al.*, 2000). Esto sugiere que la síntesis de alanina puede ser importante para mantener una “regulación óptima” de las concentraciones de compuestos de carbono y de carbono-nitrógeno dentro del bacteroide (Allaway *et al.*, 2000), ya que diversos estudios de transporte de aminoácidos en la membrana peribacteroidal concluyen que no existen transportadores para ellos, como cabría esperar si se utilizaran como metabolitos de intercambio (Day, 2001; Wittehead *et al.*, 1998).

Recientemente se publicó un estudio en el que se sobreexpresa al gen que codifica para la enzima alanina deshidrogenasa en nódulos producidos por *R. leguminosarum* (Lodwig *et al.*, 2004). Las plantas inoculadas con esa cepa están limitadas de nitrógeno, mientras que sus

bacteroides fijan nitrógeno como los de la cepa silvestre (Lodwig *et al.*, 2004). Al parecer, la modificación de los niveles de la alanina deshidrogenasa modifica los cocientes de compuestos con carbono y carbono-nitrógeno en los bacteroides, y con ello se afecta la regulación metabólica (Lodwig *et al.*, 2004; Patriarca *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que los aminoácidos participan en procesos de intercambio con la planta con los que la simbiosis podría controlarse metabólicamente (Appels y Haaker, 1991; Kahn *et al.*, 1985). Estos modelos de intercambio metabólico proponen que a cambio del amonio que los bacteroides proporcionan a las plantas, los bacteroides reciben un compuesto con carbono y nitrógeno (un aminoácido, por ejemplo). Si los bacteroides dejaran de fijar nitrógeno, la planta reduciría la síntesis de aminoácidos y cortaría el flujo de energía, limitando a los bacteroides (Kahn *et al.*, 1985). En este sentido, los bacteroides tienen transportadores para aminoácidos con alta afinidad por ellos, pero no así la membrana peribacteroidal (Whittehead *et al.*, 1998), lo que hace poco probable que dichos modelos de intercambio operen en la simbiosis (Day *et al.*, 2001).

La relación de la degradación de los aminoácidos y la fijación simbiótica de nitrógeno también se ha estudiado, en *S. meliloti*, la aspartato transaminasa A (AatA) permite utilizar a ese aminoácido como única fuente de carbono y nitrógeno, y la mutación del gen *aatA* provoca un fenotipo Fix⁻ (Rastogi y Watson, 1991, Watson y Rastogi, 1993). La mutante *aatA* de *R. leguminosarum* también es Fix⁻ (Lodwig *et al.*, 2003). Otras dos aminotransferasas de aspartato se han descrito en *S. meliloti*, pero ninguna de ellas es importante para la relación simbiótica (Rastogi y Watson, 1991). Debido a que la membrana peribacteroidal no cuenta con transportadores para el aspartato (Whittehead *et al.*, 1998), el efecto provocado por la

mutación del gen *aata* se asocia a un posible desequilibrio metabólico carbono-nitrógeno dentro de los bacteroides (Patriarca *et al.*, 2002).

En *R. etli* se han estudiado la vías de degradación de la asparagina y la glutamina así como su papel en la simbiosis. La asparagina en *R. etli* se degrada por la asparaginasa; el gen que codifica para la asparaginasa está en un operón que tiene además un gen que codifica para una aspartasa, un gen que probablemente codifica para una permeasa de asparagina y un probable represor (Ortuño-Olea y Durán-Vargas, 2000). Las mutantes en la asparaginasa y la aspartasa son incapaces de crecer en medios de cultivos con asparagina pero presentaron fenotipo simbiótico silvestre (Huerta-Zepeda *et al* 1997). Por su parte, para degradar a la glutamina, *R. etli* induce la expresión de la glutaminasa A (Durán *et al.*, 1995; Huerta-Saquero *et al.*, 2004). La actividad de la glutaminasa A, lo mismo que la concentración de glutamina son considerables en los bacteroides (Durán *et al.*, 1995). No se conoce si la glutamina presente en los nódulos proviene de la planta o del metabolismo del bacteroide; sin embargo, una mutante en el gen *glsA* que codifica para la glutaminasa A de *R. etli* nodula y fija nitrógeno como la cepa silvestre (Durán *et al.*, 1995). Además, existen otras vías de degradación de la glutamina que tienen actividad constitutiva, lo cual sin la mutantes pertinentes, puede subestimar la importancia de la degradación de la glutamina en los bacteroides de *R. etli*. Otras mutantes que no pudieran degradar ni glutamina ni glutamato podrían dar información sobre el destino del carbono de la glutamina en los bacteroides. Pero por el papel central de esta vía en la síntesis de compuestos con nitrógeno y en la regulación del metabolismo de nitrógeno, las cepas podrían tener el metabolismo muy afectado, dificultando la interpretación de los resultados.

Si bien no se han encontrado transportadores para aminoácidos en la membrana de los simbiosomas, el transporte de aminoácidos se estudió en *R. leguminosarum*. En esa bacteria

dos transportadores de baja especificidad *aap* y *bra* transportan a los aminoácidos; la mutación de cada uno de ellos reduce el transporte de los aminoácidos por las células, pero no disminuye la actividad de fijación de nitrógeno (Lodwig *et al.*, 2003). En cuanto a la doble mutante *aap, bra*, presenta un fenotipo desconcertante; si bien tiene el transporte de aminoácidos muy reducido, la inoculación de plantas susceptibles produce nódulos, dentro de los cuales hay bacteroides maduros que fijan nitrógeno a niveles más altos que los de la cepa silvestre (Lodwig *et al.*, 2003). Sin embargo, el nitrógeno fijado por los bacteroides *aap, bra* no se transporta a las plantas, que en consecuencia están limitadas de nitrógeno (Lodwig *et al.*, 2003). Los autores proponen que un ciclo de entrada y salida de aminoácidos se encarga del intercambio metabólico entre la planta y el bacteroide y que dicho ciclo operaría por reacciones de transaminación; para argumentar en favor de ese esquema sugieren que las mediciones de transporte en las membranas de los simbiosomas no son correctas porque se dañan al ser aislados (Lodwig *et al.*, 2003). Otra interpretación posible de los resultados es un esquema en el que, para la formación de los nódulos se requiera el intercambio inicial de nitrógeno en los hilos de infección, nitrógeno que resultaría del metabolismo de aminoácidos (Patriarca *et al.*, 2002).

El control del metabolismo durante la diferenciación de los bacteroides

Con estudios de microarreglos de DNA de la bacteria *S. meliloti*, se encontró que un número cercano a 200 genes reducen su expresión o se tornan indetectables en bacteroides si se les compara con su expresión en vida libre; algunos de esos genes participan en el metabolismo de nitrógeno y en el control del ciclo celular (Becker *et al.*, 2004). El hecho de que los estudios se hayan realizado con nódulos completos puede sesgar los resultados, pues representan una mezcla de bacteroides en los diversos estadios de desarrollo. Para tener una

visión mas precisa de la expresión de genes específicos, otros grupos de trabajo han utilizado fusiones transcripcionales con genes reporteros que permiten mediciones *in situ* y por lo tanto proporcionan información espacio-temporal (Patriarca *et al.*, 2002). Con ese tipo de estudios se ha llegado a un esquema en el que las actividades de fijación de nitrógeno y asimilación de amonio en las bacterias que fijan nitrógeno en simbiosis están reguladas en sentidos contrarios. Cuando la fijación de nitrógeno es activa, la asimilación de amonio no es activa o presenta niveles muy reducidos (Patriarca *et al.*, 2002). El proceso de desacoplamiento de las actividades de asimilación de amonio y fijación de nitrógeno involucra la adecuación de la expresión de algunos de los genes del control del metabolismo de nitrógeno (Ercolano *et al.*, 2001; Patriarca *et al.*, 2002). Dicho proceso ocurre durante el crecimiento de los bacteroides en los hilos de infección y se completa con la endocitosis de las bacterias por las células vegetales.

En la simbiosis con la planta *Vicia hirsuta*, se descubrió que los genes bacterianos que codifican para enzimas de asimilación de amonio reducen su expresión cuando los bacteroides son endocitados a las células vegetales, posteriormente los promotores de los genes que regulan el metabolismo de nitrógeno (*gstI*, *ntrC* y *glnB*) se dejan de expresar (Patriarca *et al.*, 1996; Taté *et al.*, 1998).

El transporte de amonio en las bacterias *R. etli*, *A. caulinodans* y *R. leguminosarum* se realiza por el transportador *amtB*, este gen forma un operón con el gen *glnK* (el cual codifica para la proteína PII). Dicho operón se inactiva pronto durante el inicio de la simbiosis y por lo tanto las bacterias pierden la actividad de transporte de amonio (Michael-Reydellet *et al.*, 1998; O'Hara *et al.*, 1985; Taté *et al.*, 1998; Taté *et al.*, 2001). Los promotores de los genes *glnK-amtB* y *glnII* (GSII) son regulados en vida libre por la proteína NtrC en respuesta a la

cantidad de amonio disponible (Patriarca *et al.*, 1992; Taté *et al.*, 1998). Las actividades de esos promotores son más bajas en medios con glutamina que en aquellos con amonio (Patriarca *et al.*, 2002). El cambio de niveles de expresión en la simbiosis implica que hay un cambio en la disponibilidad de amonio cuando los bacteroides son endocitados o que en esa condición están bajo la regulación de otros sistemas. La expresión forzada del gen *amtB* durante la simbiosis tiene un efecto negativo para la formación de los bacteroides, pues se ve retrasada y reducida, presentándose nódulos pequeños, poco pigmentados y con una cantidad menor de células vegetales colonizadas (Taté *et al.*, 1999a).

La inactivación del transportador de amonio durante la formación de los simbiosomas parece correlacionar con el papel del amonio en la formación de los nódulos. El amonio producido por la nitrogenasa en los nódulos indeterminados es una señal necesaria para la inactivación del meristemo apical (Arcondéguy *et al.*, 1997; Vasse *et al.*, 1990). Los bacteroides capaces de fijar nitrógeno inhiben la formación de otros nódulos, mientras que la inoculación con mutantes Fix^- induce un mayor número de nódulos debido a procesos de reinfección (Hirsch *et al.*, 1983). Para las plantas, el amonio producido en los nódulos reprime la síntesis de flavonoides e isoflavonoides, pues su inoculación con mutantes Fix^- permite continuar la síntesis de esos compuestos (Grosskopf *et al.*, 1993). En la formación de nódulos determinados, el amonio producido por la nitrogenasa no participa en la maduración del nódulo, pues cepas que no fijan nitrógeno forman nódulos similares a los de la cepa silvestre; de hecho, una mutante Nif^- de *R. etli* forma bacteroides que acumulan mayor cantidad de poli-beta-hidroxibutirato en los bacteroides (Cermola *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 1986). En los nódulos determinados, es posible que el amonio producido debido a la utilización de

aminoácidos como fuentes de carbono participe en el proceso de maduración de los simbiosomas (Patriarca *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el cambio de fuente de carbono durante la endocitosis de las bacterias a las células vegetales podría provocar una limitación extrema de nitrógeno y tener un papel en la diferenciación irreversible de los bacteroides (Patriarca *et al.*, 2002). Un fenómeno parecido se observa en la bacteria *Bacillus subtilis*, en la que el proceso de esporulación se puede desencadenar diluyendo los cultivos en un medio sin nitrógeno (López *et al.*, 1981).

El desacoplamiento de la fijación de nitrógeno y la asimilación de amonio en *R. etli* incluye la desactivación del promotor *nifR3-ntrBC*, ese promotor es activo durante la formación del nódulo, pero después de la activación de los genes *nif* se apaga (Patriarca *et al.*, 1996). No solo se apaga la expresión del promotor, sino que la misma proteína NtrC que participa en la regulación del metabolismo de nitrógeno junto con las proteínas PII y el factor sigma 54, se hidroliza por un mecanismo aún no comprendido (Patriarca *et al.*, 1996).

El acoplamiento artificial de la asimilación de amonio y la fijación de nitrógeno mediante la expresión de la enzima GDH de *E. coli* bajo el control del promotor *nifHc* en *R. etli* aumenta la concentración de los aminoácidos en los bacteroides, reduce la concentración de ureidos en el xilema de las plantas y reduce la expresión de la nitrogenasa, pero no de los genes *nifHDK*, provocando la senescencia prematura de los nódulos (Mendoza *et al.*, 1998).

El metabolismo nitrogenado en *R. etli* tiene cualidades distintas con respecto a otros sistemas; aunque primordialmente los factores sigma 54 son utilizados en el metabolismo de nitrógeno, se ha observado que participan en otras funciones metabólicas (Merrick y Edwards, 1995). En *R. etli* se demostró la presencia de dos genes que codifican para factores sigma 54, uno de ellos (*rpoN1*) se utiliza esencialmente para la vida libre, mientras que el otro (*rpoN2*)

es necesario para algunas actividades de la simbiosis (Michiels *et al.*, 1998a y 1998b). El gen que se utiliza en la vida libre controla la utilización del nitrato y de los dicarboxilatos (Michiels *et al.*, 1998a). Además, *rpoN1* se requiere para la utilización de los aminoácidos alanina y serina, que aparentemente no pueden ser utilizados en la mutante *rpoN1* por una inhibición de la asimilación de amonio (Michiels *et al.*, 1998a). RpoN1 se expresa en aerobiosis, mientras que en las condiciones simbióticas de microaerobiosis se expresa la proteína RpoN2 (Michiels *et al.*, 1998a y 1998b).

Síntesis de polímeros de carbono en los bacteroides

Algunas bacterias simbióticas acumulan polímeros de carbono cuando se encuentran fijando nitrógeno en los bacteroides. *R. etli*, *B. japonicum* y *Rhizobium sp* NGR234, acumulan altas concentraciones del polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB); mientras que otras especies como *S. meliloti* y *R. leguminosarum* acumulan poca cantidad del polímero (Cevallos *et al.*, 1996; Herrada *et al.*, 1989; Povoló *et al.*, 1994; Tombolini y Nuti, 1989; Walshaw *et al.*, 1997). Al parecer las razones de la síntesis de PHB son la regulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del poder reductor dentro de los bacteroides, ya que la acetil CoA y el NADP(H) pueden dirigirse hacia la síntesis de PHB o hacia el ciclo de Krebs (Poole y Allaway, 2000). El PHB se puede utilizar como fuente de energía para la fijación de nitrógeno, ya que en bacteroides de la soya el PHB se degrada estimulando la fijación de nitrógeno cuando no hay una fuente de carbono disponible (Bergensen *et al.*, 1991; Bergensen y Turner, 1993). Es posible que el PHB se acumule por la diferencia de velocidades de utilización de energía para la fijación de nitrógeno y el suministro de carbono al bacteroide, ya que una mutante Nif de *R. etli* acumula el polímero antes que la cepa silvestre (Taté *et al.*, 1994). La inhibición de la síntesis del PHB en *R. etli* aumenta la fijación de nitrógeno, al tiempo de que

el polímero glicógeno se sintetiza en grandes cantidades (Cevallos *et al.*, 1996), implicando que de alguna forma el carbono está en exceso y se debe almacenar.

II) LA RESPUESTA ESTRICTA EN BACTERIAS

Durante sus ciclos de vida, las bacterias están expuestas a cambios en la disponibilidad de los nutrientes. Las variaciones en las concentraciones de los nutrientes podrían llevar a la reducción de la viabilidad de dichos organismos en caso de no adaptarse a esas nuevas condiciones. Las bacterias tienen el sistema de la respuesta estricta para evitar que esos cambios –abruptos o no-, modifiquen su viabilidad a largo plazo: la respuesta estricta es un sistema de transducción de la señal de limitación de nutrientes –principalmente aminoácidos y fuente de carbono- y provoca la reducción del metabolismo celular. Los mediadores de la respuesta estricta son el pentafofato y el tetrafofato de guanosina (ver adelante) que modifican los procesos de síntesis de RNA estable, la transcripción y la traducción. La respuesta estricta se relaciona con otros sistemas de adaptación bacteriana, como las respuestas al estrés por calor u otros factores físicos, formando en conjunto el sistema global de resistencia a los cambios ambientales en las bacterias.

El descubrimiento de la respuesta estricta bacteriana se hizo en *Escherichia coli* durante las décadas 1950s y 1960s cuando se estudiaba el fenómeno de la lisis bacteriana mediada por la inducción del Bacteriofago Lambda por luz UV. Los cultivos de algunas cepas lisógenas de *E. coli* que eran limitados de aminoácidos o de glucosa antes de recibir radiación UV, mostraban un menor efecto lítico (Borek, 1952). Dicho fenómeno de resistencia se creyó ligado a la producción de un compuesto capaz de absorber radiación UV. Pero se demostró que independientemente de los fenómenos lítico o lisogénico, la limitación de aminoácidos provocaba en una cepa auxótrofa de metionina la acumulación de RNA, pero no de DNA ni de proteínas; mientras que otras cepas no acumulaban RNA (Borek *et al.*, 1955, 1956). La relación entre la síntesis de proteínas y el RNA aún no estaba firmemente establecida, por lo

que las investigaciones tomaron un rumbo independiente del ciclo de desarrollo del bacteriófago.

Al fenómeno de síntesis de RNA luego de la limitación de aminoácidos en la bacteria *E. coli* se le denominó control de RNA o RC (RNA control), definiéndose dos fenotipos:

1) El fenotipo relajado (RC^{rel}); que se caracteriza por la producción de RNA durante la limitación de aminoácidos en el medio de cultivo. Corresponde al fenotipo de cepas mutantes que continúan la síntesis de RNA cuando no hay aminoácidos para la síntesis de proteínas (Cashel, 1969).

2) El fenotipo estricto (RC^{str}); que se caracteriza por la inhibición de la producción de RNA durante la limitación de aminoácidos en el medio de cultivo. Corresponde al fenotipo de las cepas silvestres de la especie (Cashel, 1969).

La búsqueda de las diferencias entre las cepas relajadas y las cepas estrictas llevó al estudio de su metabolismo de ácidos nucleicos mediante cromatografía de capa fina. En las autoradiografías de las placas cromatográficas de extractos de cultivos de cepas estrictas limitadas de aminoácidos y marcadas con ^{32}P , se descubrieron dos compuestos que se denominaron MSI y MSII (magic spots) (Cashel y Galland, 1969). La dependencia de la síntesis de MSI y MSII de la limitación de aminoácidos se comprobó porque al adicionar los aminoácidos faltantes las cepas dejan de sintetizar MSI y MSII y reinician la síntesis de RNA (Cashel y Galland, 1969). MSI y MSII son compuestos que resultan de la adición de un grupo pirofosfato derivado del ATP, en el grupo 3' OH del GDP o del GTP respectivamente. MSI es 3',5'-bis-pirofosfato de Guanosina o tetrafosfato de Guanosina, derivado del GDP (ppGpp), y MSII corresponde al compuesto 3'-bisfosfato, 5'-trifosfato de Guanosina o pentafofosfato de

Guanosina, derivado de GTP (pppGpp). Colectivamente, los compuestos pppGpp y ppGpp se abrevian (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996).

La respuesta estricta puede ser provocada experimentalmente limitando de aminoácidos o de fuente de carbono a los cultivos bacterianos. La limitación de aminoácidos se produce mediante la omisión de uno o varios aminoácidos en el medio de cultivo; o bien, mediante la adición de hidroxamato de serina que inhibe la aminoacilación del tRNA para serina (tRNA^{ser}), aumentando las concentraciones de tRNA^{ser} no aminoacilado (Cashel, 1994). Para provocar la respuesta estricta por limitación de fuente de carbono, se reduce la concentración de la fuente de carbono (usualmente glucosa) a un décimo de la concentración normal y se incuban las células hasta que esa concentración se agote (Cashel, 1994).

La respuesta estricta en *E. coli*. Dos genes involucrados en la síntesis de (p)ppGpp

El sistema de respuesta estricta mejor estudiado es el de la bacteria *E. coli*, pero en reportes de estudios en otras especies se muestran grandes diferencias (Chatterji y Ojha, 2001). En *E. coli* la respuesta estricta utiliza los productos de los genes *relA* y *spoT* para sintetizar (p)ppGpp. El producto del gen *relA* está ligado a la producción de (p)ppGpp en respuesta a la falta de tRNA aminoacilados para la síntesis de proteínas; mientras que el producto del gen *spoT* es una proteína bifuncional que responde a la limitación de fuente de energía en el medio de cultivo sintetizando (p)ppGpp, y en condiciones de limitación de aminoácidos se encarga de hidrolizar el (p)ppGpp producido por la proteína RelA (Cashel *et al.*, 1996). El nombre del gen *relA* es nemotécnico de relajado (Cashel *et al.*, 1996). Por su parte, el nombre *spoT* proviene de que las placas de cromatografía de algunas mutantes no tienen “manchas mágicas” (son spotless) en limitación de fuente de carbono; esas cepas se obtuvieron por mutagénesis de un segundo *locus* para la respuesta estricta en cepas deletadas del gen *relA* ($\Delta relA$) para lograr

que no sintetizaran (p)ppGpp en respuesta a la limitación de carbono; al gen involucrado se le nombró *spoT* (Cashel *et al.*, 1996).

El gen *relA* de *E. coli*

El gen *relA* de *E. coli* está localizado en 59.2 minutos del cromosoma, tiene 743 codones y la proteína producida tiene una masa de 84 kDa; el gen posee un codón de terminación amar, que cuando se suprime, aumenta la longitud de la proteína 27 residuos y la inactiva (Cashel *et al.*, 1996). La proteína RelA sintetiza (p)ppGpp de una manera dependiente de los ribosomas durante la limitación de aminoácidos (ver adelante). La expresión de un gen *relA* truncado en el codón 455 produce una proteína con capacidad de síntesis constitutiva de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996). La regulación de la síntesis de (p)ppGpp por RelA está regulada por la limitación de aminoácidos, pues si se sobreproduce la proteína, los niveles de (p)ppGpp aumentan solo un poco (Schreiber *et al.*, 1991). La actividad de síntesis de (p)ppGpp es una reacción de transferencia de los grupos β,γ -fosfato del ATP al grupo hidroxilo 3' de la ribosa del GTP o del GDP (Cashel *et al.*, 1996).

Existen dos formas sencillas de saber si una cepa de *E. coli* es mutante del gen *relA*. Una de ellas es crecerla en medio mínimo con una mezcla de serina, metionina y glicina, que desequilibra la expresión de los operones de síntesis de aminoácidos y que solo las cepas silvestres para *relA* pueden aliviar. El otro método es la utilización del inhibidor de la síntesis de histidina, aminotriazol (AT), en el medio de cultivo. Como el (p)ppGpp aumenta la expresión del operón de síntesis de histidina, sólo las cepas que producen suficiente concentración de (p)ppGpp pueden crecer en esa condición (Cashel *et al.*, 1996).

El gen *spoT*

El gen *spoT* de *E. coli* está en el minuto 82 del cromosoma, y codifica para una proteína de 702 aminoácidos y 79 kDa. Como se mencionó anteriormente, el gen *spoT* se encontró al buscar que mutantes nulas de *relA* ya no sintetizaran (p)ppGpp (Hernández y Bremer, 1991). La delección del gen *spoT* en cepas silvestres de *E. coli* es letal, debido a la permanencia de altas concentraciones de (p)ppGpp sintetizado por la proteína RelA; sin embargo en fondos silvestres se pueden obtener alelos que no inactiven completamente a la proteína SpoT (Cashel *et al.*, 1996). El gen *spoT* está en un operón que comprende a los genes *gmk-rpoZ—spoT-spoU-recG*: el gen *gmk* parece codificar para una guanilato ciclasa, *rpoZ* codifica para la subunidad omega de la RNA polimerasa, *spoU* codifica para una metiltransferasa, mientras que *recG* codifica para una proteína que participa en la recombinación homóloga de DNA (Gentry y Burgess, 1986; Gentry y Burgess, 1989; Koonin y Rudd, 1993; Whitby *et al.*, 1993). La actividad de degradación de (p)ppGpp por la proteína SpoT es dependiente del catión manganeso y fue cuantificada *in vitro*. La actividad de sintetasa de (p)ppGpp de la proteína SpoT aún no ha sido demostrada *in vitro*, aunque la evidencia *in vivo* es suficientemente clara (Gentry y Cashel, 1996; Xiao *et al.*, 1991). Las delecciones del gen *spoT* solo son viables en cepas deletadas del gen *relA*; las dobles mutantes $\Delta relA$ y $\Delta spoT$ se denominan (p)ppGpp⁰, esas cepas están afectadas en varias vías del metabolismo y presentan auxotrofia a varios aminoácidos, no importando si son derivadas de cepas protótrofas (Xiao *et al.*, 1991).

Las actividades de síntesis y degradación de (p)ppGpp se encuentran en el amino terminal de la proteína SpoT en dos dominios diferentes; una proteína truncada que contiene los residuos 1-374 es capaz de realizar las dos actividades (Hernández y Cashel, 1995). Una proteína truncada con los primeros 203 aminoácidos tiene actividad de degradación de (p)ppGpp *in vivo*, mientras que una proteína truncada que tiene la región del aminoácido 67 al

aminoácido 374 es capaz de realizar la síntesis de (p)ppGpp *in vivo* (Gentry y Cashel, 1996) (ver adelante estudio de cristalografía de una proteína de la familia RelA/SpoT). La proteína SpoT se encarga de mantener las concentraciones de (p)ppGpp durante la limitación de carbono, ya que la proteína RelA sintetiza la “carga” inicial (Gentry y Cashel, 1996). La proteína SpoT es la principal actividad catalítica de las células para hidrolizar ppGpp y pppGpp hasta GDP y GTP, la reacción requiere del catión magnesio como cofactor y presenta la mismas constantes cinéticas y bioquímicas para ambos compuestos (Cashel *et al.*, 1996).

Las secuencias de las proteínas RelA y SpoT están interrelacionadas

La secuencias de las proteínas RelA y SpoT de *E. coli* presentan 219 residuos idénticos y 308 residuos con reemplazos conservativos (que representan 31% de identidad y 54% de conservación) (Metzger *et al.*, 1989). La mayor similitud se observa en la región amino terminal de las proteínas, que es donde se encuentran los dominios con actividad de síntesis y degradación de (p)ppGpp de la proteína SpoT (Metzger *et al.*, 1989). La identidad y los cambios conservativos de las secuencias sirvieron como base para hipotetizar que los genes *relA* y *spoT* son resultado de una duplicación y diversificación de funciones (Metzger *et al.*, 1989). A pesar de la gran similitud de las secuencias de las proteínas RelA y SpoT sobre todo la región amino terminal, no se puede asignar con certeza una actividad de RelA o SpoT a una proteína homóloga a partir de su secuencia.

El dominio HD

En un estudio de comparación de secuencias de diversas proteínas de la superfamilia de proteínas con capacidad de hidrolizar enlaces fosfato (fosfohidrolasas) de diversos organismos, se encontró un dominio con cinco motivos conservados, tres de ellos con significancia estadística (motivos I, II y V). El dominio se nombró HD porque tiene

conservados residuos de los aminoácidos Histidina y Aspartato (H y D) en el motivo II, este dominio está presente en fosfohidrolasas dependientes de cationes divalentes, como las nucleotidil transferasas, las helicasas tipo II, en enzimas con actividad de uridil transferasa y en la familia de proteínas de la respuesta estricta (RelA/SpoT) (Aravind y Koonin, 1998). Es interesante que las proteínas homólogas a RelA y SpoT que degradan (p)ppGpp, conserven los residuos H y D del motivo II del dominio HD, mientras que la proteína RelA de *E.coli* tiene esos residuos substituidos y no puede hidrolizar (p)ppGpp. Se propone que la presencia del dominio HD, en particular los residuos H y D del dominio II hacen la diferencia entre una proteína de la respuesta estricta con capacidad de hidrólisis de otra que no la tiene (Aravind y Koonin, 1998). La mutagénesis del residuo histidina en el motivo II (que tiene la secuencia HD) o del residuo de aspartato del motivo V afectan severamente la actividad de degradación de (p)ppGpp (Turko *et al.*, 1998).

Otros genes que participan en la regulación de la respuesta estricta

El gen *relC* o *rplK*

Como la síntesis de (p)ppGpp por la proteína RelA es dependiente de los ribosomas (ver adelante), algunas mutaciones que afectan la estructura tridimensional de los ribosomas también afectan la respuesta estricta (Cashel *et al.*, 1996). Las mutantes en el gen *relC* o *rplK* que codifica para la proteína ribosomal L11 sintetizan sólo un 10% de (p)ppGpp durante la respuesta estricta por limitación de aminoácidos, esa mutación originalmente fue denominada *relC* por producir un fenotipo relajado y ser diferente a *relA* (Friesen *et al.*, 1974).

El gen *gpp*

El gen *gpp* codifica para una enzima con actividad de Gppasa que se encarga de convertir al pppGpp en ppGpp, la concentración de pppGpp es mayor que la de ppGpp, debido a que la

concentración de GTP es mayor que la de GDP en las bacterias (Cashel *et al.*, 1996). La actividad de la enzima no es necesaria para la respuesta estricta, pues aparentemente las actividades fisiológicas de ambos nucleótidos son similares (en la mutante *gpp* la respuesta estricta no es diferente a la de la cepa silvestre) (Belitskii *et al.*, 1986).

Los genes *rpoBCD*

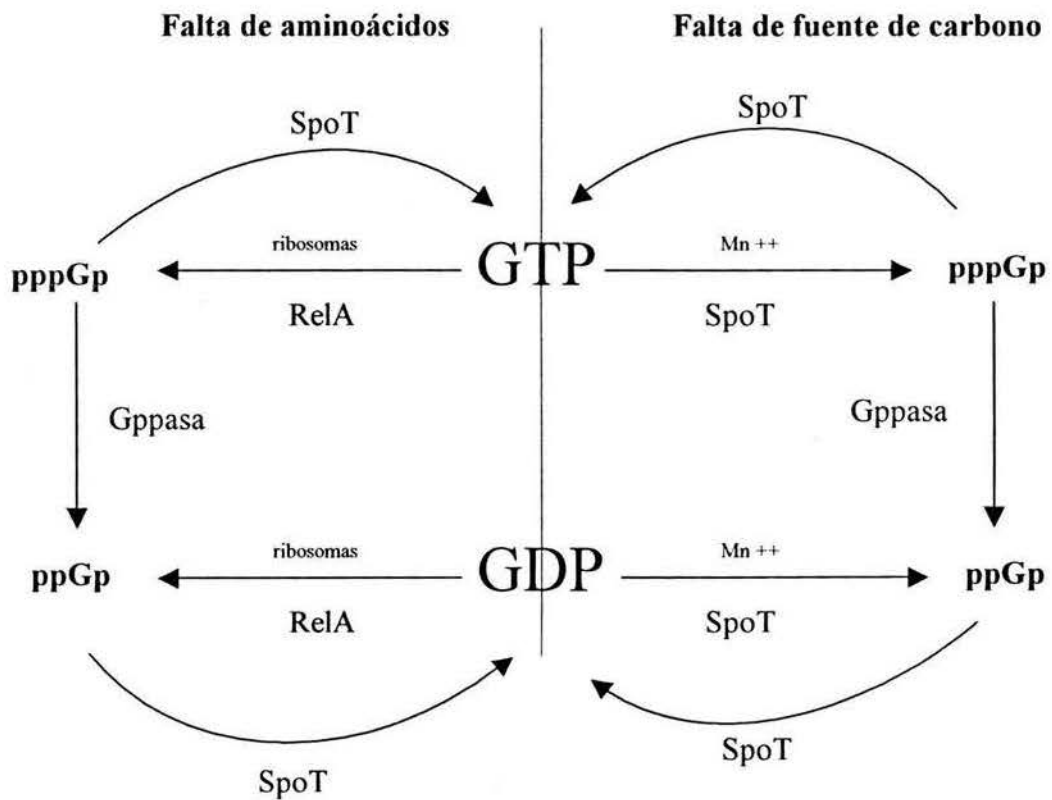
Siendo el principal efecto del (p)ppGpp la inhibición de la síntesis de RNA, se ha investigado intensamente el punto donde ese compuesto actúa sobre la RNA polimerasa. Mediante la técnica de entrecruzamiento químico (crosslinking), utilizando análogos de (p)ppGpp como agentes de entrecruzamiento y con técnicas de cristalografía de la RNA polimerasa con y sin (p)ppGpp, se encontraron los sitios de unión del (p)ppGpp con la RNA polimerasa (Chatterji *et al.*, 1998). Los fragmentos proteicos en los que se liga el (p)ppGpp son los residuos 802-1211 y 1216 o 1223 del carboxilo terminal de la subunidad β , que es codificada por el gen *rpoB* (Chatterji *et al.*, 1998; Glass *et al.*, 1986). Con un análogo mas pequeño de (p)ppGpp se identificó al amino terminal de la subunidad β' (codificada por el gen *rpoC*) como otro blanco de unión de (p)ppGpp (Toulokhnov *et al.*, 2001). Con base en modelos tridimensionales de la RNA polimerasa, se postula que el carboxilo terminal de la subunidad β y el amino terminal de la subunidad β' están cercanos y que el (p)ppGpp se une alostéricamente en esa zona (Chatterji *et al.*, 1998; Toulokhnov *et al.*, 2001).

En concordancia con los resultados de unión de análogos de (p)ppGpp en la RNA polimerasa, algunas mutaciones en los genes *rpoB* y *rpoC* modifican la respuesta estricta en diversas especies de bacterias (Cashel *et al.*, 1996). La mayoría de esas mutantes se encuentran por reversión de la dependencia de la RNA polimerasa a las concentraciones de

(p)ppGpp o simplemente por la reversión de algunos aspectos del fenotipo (Cashel *et al.*, 1996).

Algunas mutaciones en la región 3' del gen *rpoD* (que codifica para el factor sigma 70 de la RNA polimerasa) afectan la respuesta de la RNA polimerasa a las concentraciones de (p)ppGpp (Hernández y Cashel, 1995); por otra parte, la reducción de la producción de la proteína sigma 70 en un cepa (p)ppGpp⁰ mimetiza la respuesta estricta (Magnusson *et al.*, 2003). Los anteriores hechos se deben a que la afinidad de la RNA polimerasa por los factores sigma y por los distintos tipos de promotores se modifica por la presencia de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996).

Figura 1.



Esquema general de la respuesta estricta en condiciones de falta de aminoácidos o de falta de fuente de carbono. Durante la respuesta por falta de carbono la síntesis inicial de (p)ppGpp se lleva a cabo por RelA, que no se muestra.

La síntesis de (p)ppGpp dependiente de ribosomas

Los ribosomas son estructuras que crean un sitio donde interactúan los codones del mRNA y moléculas de tRNA aminoaciladas. Los aminoácidos que acarrean los tRNA aminoacilados pueden unirse con la acción de la peptidil transferasa y dar lugar una cadena polipeptídica. Los ribosomas tienen tres sitios: A, P y E. Un ribosoma unido a un mRNA que ya ha iniciado la síntesis de proteínas une momentáneamente en el sitio E al tRNA que ya donó su aminoácido, en el sitio P une al tRNA aminoacilado que porta la cadena polipeptídica y en el sitio A une al tRNA aminoacilado que corresponde al siguiente aminoácido que ha de ser incorporado a la cadena polipeptídica.

En el caso de que la cantidad de aminoácidos presentes en la célula no sea suficiente para aminoacilar a los tRNA de una cierta especie, se presentará una proporción de tRNA no aminoacilados, en cuanto más grande es esa proporción, la probabilidad de que se una un tRNA no aminoacilado al sitio A del ribosoma es mayor. Cuando al sitio A de un ribosoma se une un tRNA no aminoacilado, se dice que el ribosoma presenta un codón de hambre (Cashel *et al.*, 1996). Al ser menor la afinidad del sitio A por un tRNA aminoacilado que por uno sin aminoacilar, el tRNA no aminoacilado puede ser desplazado cuando la concentración de los aminoácidos es suficiente para aminoacilar a los tRNAs (Wendrich *et al.*, 2002).

La síntesis de (p)ppGpp por la proteína RelA requiere de ribosomas completos con un mRNA y de un codón de hambre. Inicialmente se pensaba que la síntesis de (p)ppGpp por la proteína RelA desplazaba al tRNA no aminoacilado del sitio A para permitir la entrada de un

tRNA aminoacilado y que la proteína RelA respondía a la relación tRNA aminoacilado/tRNA no aminoacilado (Cashel *et al.*, 1996). Pero en una elegante serie de experimentos Wendrich y colaboradores encontraron los eventos que permiten la síntesis de (p)ppGpp dependiente de los ribosomas:

- La síntesis de (p)ppGpp requiere de ribosomas completos, mRNA que tenga una extensión 3' luego del ribosoma, la unión de un tRNA no aminoacilado al sitio A del ribosoma y los nucleótidos GTP y ATP.
- Al aumentar la cantidad de ribosomas con codones de hambre con respecto a la proteína RelA, aumenta la cantidad de (p)ppGpp sintetizado, lo que implica que RelA se disocia de los ribosomas con la síntesis de (p)ppGpp o que se asocia con varios ribosomas.
- La unión de RelA con los ribosomas tiene una estequiometría cercana a 1, no depende de la unión de un tRNA no aminoacilado al sitio A y está inversamente correlacionada con la síntesis de (p)ppGpp.
- La proteína ribosomal L11 codificada por el gen *relC* es necesaria para la síntesis de (p)ppGpp, pero no para la unión entre el ribosoma y la proteína RelA.
- El aumento de la extensión 3' del mRNA aumenta la afinidad de la proteína RelA por el ribosoma.
- La síntesis de (p)ppGpp no cambia la afinidad del tRNA no aminoacilado por el sitio A del ribosoma.

Por lo tanto, la manera de acción de la proteína RelA es medir la cantidad de ribosomas que tienen detenida la síntesis de proteínas (los que tienen una extensión 3' y un codón de hambre). Con la síntesis de (p)ppGpp la proteína RelA se disocia de un ribosoma y puede unirse a otro. La síntesis de (p)ppGpp es reflejo de la cantidad de ribosomas con síntesis de

proteínas detenida, al tiempo que el (p)ppGpp sintetizado disminuye la afinidad de RelA por los ribosomas. Cuando se tienen otra vez aminoácidos para la aminoacilación se restablecen los niveles de tRNA aminoacilados que se unen preferentemente al ribosoma que los no aminoacilados (Wendrich *et al.*, 2002).

Aún no se conoce con certeza el evento por el que el (p)ppGpp se sintetiza en respuesta a la limitación de carbono.

Control de la síntesis de ribosomas

En bacterias que se dividen con rapidez, la maquinaria de síntesis de proteínas juega un papel central en la velocidad de crecimiento. La producción de ribosomas y la síntesis de proteínas en tales circunstancias constituye el gasto principal de energía biosintética y una célula bacteriana llega a tener 70,000 ribosomas (Cashel *et al.*, 1996). Por ello, cuando la energía para el crecimiento bacteriano o los aminoácidos son limitantes, la cantidad de ribosomas ha de ser ajustada. La cantidad de energía invertida en la síntesis de ribosomas es alta si se toma en cuenta que más de la mitad del RNA de una bacteria que crece rápidamente corresponde a rRNA (Condon *et al.*, 1995).

Los ribosomas están formados por proteínas y por moléculas de RNA (rRNA). La síntesis de las proteínas que forman parte de los ribosomas está determinada por los niveles de rRNA presentes al momento de ensamblar a los ribosomas (Condon *et al.*, 1995). En el mecanismo más utilizado para la regulación de la síntesis de proteínas ribosomales (como S4, S7, S8, L1, L10), las moléculas de rRNA y los propios mRNA de las proteínas ribosomales compiten por las proteínas. Cuando las proteínas ribosomales rebasan la cantidad de rRNA durante el ensamblaje de los ribosomas, se unen a su propio mRNA impidiendo la síntesis de más proteína (Condon *et al.*, 1995). Otros métodos de regulación de síntesis de proteínas

ribosomales incluyen la finalización temprana de la transcripción. Estando controlada la síntesis de proteínas ribosomales por la cantidad de rRNA es en esta especie de RNA que se basa la regulación de cantidad de ribosomas (Condon *et al.*, 1995).

La bacteria *E. coli* tiene 7 operones no contiguos para la síntesis de RNA ribosomales, *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*; de cada operón se obtienen tres especies de rRNA que están en el orden 16S RNA- 23S RNA -5S RNA. Algunos genes de tRNA son transcritos en la región espaciadora entre los RNAs 16S y el 23S. Los operones de RNA ribosomales tienen dos promotores consenso para el factor sigma 70 de la RNA polimerasa; los promotores P1 y P2 están separados entre sí por 120 pares de bases, y de P2 a 16S hay 200 pares de bases (Condon *et al.*, 1995; Zhang y Bremer, 1995). Ambos promotores tienen hexámeros parecidos a las secuencias reconocidas por el factor σ^{70} en las regiones -10 y -35 y una región rica en AT denominada elemento UP, localizada río arriba del hexámero -35, que incrementa la transcripción uniendo a los dominios carboxilo de la subunidad alfa de la RNA polimerasa (Condon *et al.*, 1995).

Por su parte el promotor P1 tiene una región rica en GC cerca del hexámero -10 que se considera el discriminador para la respuesta estricta, el discriminador está entre el -10 y el inicio de la transcripción (Zhang *et al.*, 2002). El promotor P2 no tiene ese discriminador y durante la respuesta estricta la expresión residual de rRNA proviene de ese promotor (Zhang *et al.*, 2002; Wagner, 2002). La presencia de la región discriminadora no parece ser suficiente para el control estricto, ya que por separado los dos promotores presentan control por (p)ppGpp y la inserción de la secuencia discriminadora en otros genes no siempre les confiere control por (p)ppGpp (Zhang y Bremer, 1995).

Los promotores de los rRNA tienen otros elementos: El elemento UP que está entre los nucleótidos -40 a -60, sirve para incrementar la unión de la RNA polimerasa al promotor P1. Un sitio de unión para la proteína Fis que tiene 11.2 Kda y capacidad de unión a DNA, esa proteína incrementa la iniciación de la transcripción del *rrn* P1, uniéndose entre -60 y -150, incrementando hasta 10 veces la transcripción, junto con el elemento UP, la proteína Fis puede incrementar 300 la expresión de los operones de rRNA (Gourse y Ross, 1996).

En *E. coli* el control de la síntesis de los rRNA se da por cuatro procesos: control por respuesta estricta, control dependiente de la velocidad de crecimiento, activación “upstream” y antiterminación (Wagner, 2002).

Síntesis de proteínas durante la respuesta estricta

La síntesis de proteínas en las bacterias que han entrado en respuesta estricta o que gratuitamente tienen una concentración elevada de (p)ppGpp se ve afectada, ya que se observa en geles de cromatografía bidimensional de proteínas que más de la mitad de las proteínas modifican sus niveles de expresión (Chang *et al.*, 2002). Casi la misma proporción de las proteínas afectadas lo están en sentido de disminuir su síntesis, mientras que las otras la aumentan (Cashel *et al.*, 1996). Cuando se cuantifica la expresión de mRNA, se observa que algunos de ellos elevan su expresión, mientras que otros la disminuyen y algunos permanecen constantes (Chang *et al.*, 2002). La expresión de los operones durante la respuesta estricta no parece seguir un “modelo lógico” pues si bien se puede pensar que la bacteria por tener falta de aminoácidos requiere de expresar operones para su síntesis, eso no sucede en general (Chang *et al.*, 2002).

Los genes de la respuesta estricta en otras bacterias y organismos

Con excepción de algunas bacterias que son parásitos intracelulares obligados como: *Chlamydia pneumoniae*, *C. trachomatis* (Kalman *et al.*, 1999), *Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998) y *Treponema pallidum* (Fraser *et al.*, 1998) o el simbiote de áfidos, *Buchnera sp.* APS (Shigenobu *et al.*, 2000), todos los genomas bacterianos conocidos hasta ahora tienen genes que codifican proteínas que degradan o sintetizan (p)ppGpp, por lo cual se considera que las bacterias parásitas obligadas perdieron dichos genes durante la adaptación a la vida intracelular en un proceso que se conoce como evolución reductiva (Andersson y Kurland, 1998a).

Los genes de la respuesta estricta en bacterias se han clasificado con respecto a su similitud (Mittenhuber, 2001). Las proteínas de la respuesta estricta en las bacterias hasta ahora se clasifican en cinco grupos:

RelA: Presente en las proteobacterias de las divisiones β y γ , la proteína codificada por ese gen sintetiza (p)ppGpp en forma dependiente de los ribosomas en respuesta a la limitación de aminoácidos para la síntesis de proteínas. Esas proteínas tienen sustituciones en el dominio HD.

SpoT: capaz de sintetizar y degradar ppGpp, tienen el dominio HD conservado, se encuentran en las divisiones β y γ de las proteobacterias.

Rel de origen actinobacterial, conservan el dominio HD.

Rel del grupo *Bacillus/Clostridium*, conservan el dominio HD.

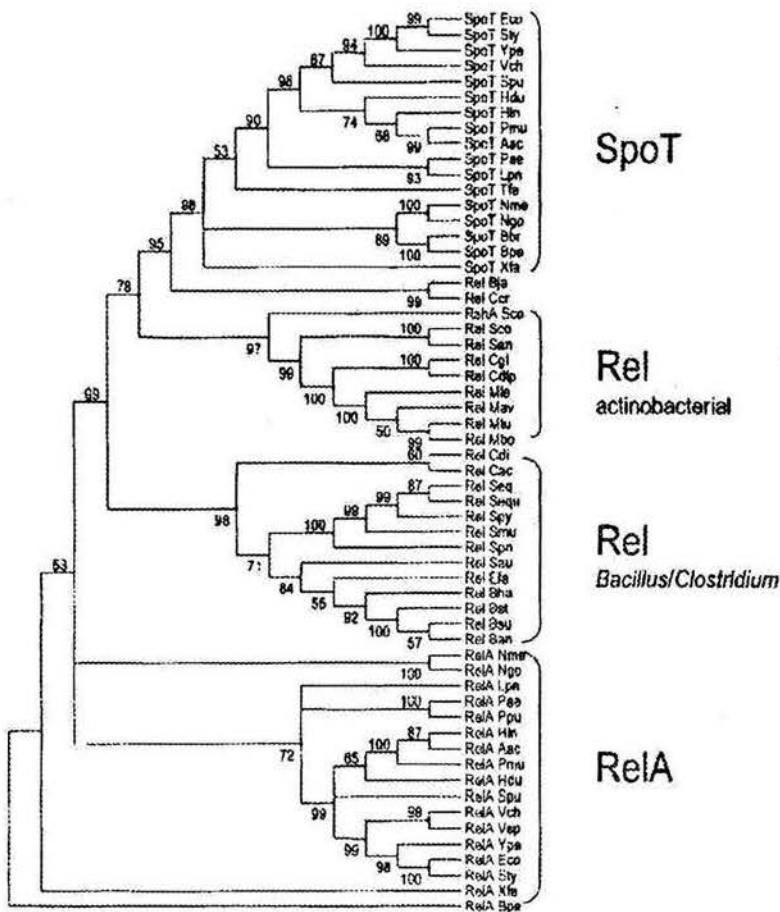
Existe otro nuevo grupo del que se han estudiado pocas secuencias, corresponde a la división α de las proteobacterias que tienen proteínas más parecidas a SpoT que a los otros grupos (figura 2).

Se considera que estos genes evolucionaron probablemente en una actinobacteria que solo tenía un gen *rel* para la respuesta estricta, para convertirse en *spoT* y responder a las limitaciones de carbono y ácidos grasos (Mittenhuber, 2001). El gen eventualmente se duplicó y una de sus copias se especializó para responder a la limitación de aminoácidos (gen *relA*) en las divisiones β y γ de las proteobacterias (Mittenhuber, 2001). Se consideraba que solo las bacterias gram positivas poseían un gen para la respuesta estricta y que las demás poseían dos, sin embargo varias especies de la división α y una especie de la división ϵ de las proteobacterias tienen sólo un gen que aparentemente codifica una proteína con capacidad de síntesis y degradación de (p)ppGpp (Mittenhuber, 2001).

A las nuevas proteínas que se encuentran en bacterias distintas a los grupos definidos se propone denominarlas simplemente como homólogas de RelA/SpoT o Rsh (homólogo a Rel y Spo), hasta que exista evidencia de su actividad o una clasificación grupal; los genes por lo pronto deben denominarse *rsh*.

En los genomas de los plastos de las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, así como en los genomas mitocondriales de otras plantas se han encontrado genes *rsh* que se coordinan con los mecanismos de defensa de las plantas. Los genes presentes en las plantas son capaces de complementar mutantes de *E. coli* en la respuesta estricta (Givens *et al.*, 2004).

Figura 2



Cladograma rectangular de secuencias de proteínas Rel, RelA y SpoT; se puede observar que hay cuatro grupos bien definidos. Las dos secuencias que no pertenecen a los cuatro grupos, (entre SpoT y RelA de actinobacterias) corresponden a las proteobacterias de la división *Bradyrhizobium japonicum* y *Caulobacter crescentus*. Tomado de Mittenhuber, 2001.

Estructura cristalográfica de la proteína Rsh de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*)

El gen que codifica para la proteína RelA/SpoT de *S. equisimilis* se expresó en la bacteria *E. coli*, en ese fondo funciona como SpoT pero no como RelA. Sin embargo, cuando se hizo un ensayo *in vitro* utilizando ribosomas de su especie se observó que también posee actividad

de RelA (Mechold *et al.*, 1996). Con el objetivo de encontrar los dominios encargados de las actividades de síntesis e hidrólisis de (p)ppGpp en la proteína Rsh de *S. equisimilis* se hicieron fusiones de diferentes regiones de la proteína; durante ese trabajo se encontró que los aminoácidos que se aumentaron para purificar a la proteína provocan la desregulación de sus actividades, y se decidió no fusionarla (Mechold *et al.*, 2002; Hogg *et al.*, 2004)

Para preparar los cristales de la proteína se utilizó un fragmento con los primeros 385 residuos de aminoácidos, esa proteína truncada tiene capacidad de síntesis y degradación de (p)ppGpp. Los cristales claramente muestran que el dominio de hidrólisis está en el amino terminal, mientras que el dominio de síntesis está cerca del centro de la proteína (Hogg *et al.*, 2004). El dominio carboxilo terminal se encarga de la regulación de la actividad de la proteína. Los cristales muestran que existen dos conformaciones posibles de la proteína Rsh, en una de ellas se observa que es accesible el dominio de síntesis, pero no el de hidrólisis de (p)ppGpp (Hogg *et al.*, 2004). En la estructura cristalográfica de la conformación que permite la hidrólisis de (p)ppGpp se encontró al compuesto 5'-difosfato-2',3'-monofosfato cíclico de guanosina que es derivado del GDP; se sospecha que ese compuesto puede ayudar en el cambio de conformación de la proteína.

III) LA RESPUESTA ESTRICTA Y EL METABOLISMO EN LAS BACTERIAS

Las alteraciones fenotípicas más importantes observadas en bacterias mutantes de la respuesta estricta se dan durante transiciones de crecimiento o durante la adaptación a nuevos ambientes, esos incluyen la infección, la persistencia en ambientes adversos, la adaptación a diferentes tipos de estrés, etc. Por ello, diversos grupos de trabajo han dedicado esfuerzos a encontrar y entender la dependencia del metabolismo la regulación bacteriana de la respuesta estricta. Es indudable la importancia del estudio de todo ese tipo de interacciones; solo que es necesario tomar en cuenta que siendo la respuesta estricta un fenómeno que afecta procesos celulares básicos como la transcripción, y la traducción; los fenómenos observados pueden deberse a una acción directa del (p)ppGpp o a una acción indirecta (Cashel *et al.*, 1996). Como ya se mencionó aquí, las mutantes de *E. coli* que no producen (p)ppGpp, sufren de desregulación metabólica general (Xiao *et al.*, 1991).

Factor sigma de estado estacionario

El gen *rpoS* codifica para un factor sigma que al ser mutado bloquea la expresión de muchos genes inducidos en fase de estado estacionario, por lo que es considerado un elemento regulatorio central del proceso de fase estacionaria (Hengge-Aronis, 1993). La entrada en fase estacionaria puede ser alcanzada por limitación de algún nutriente como carbono, nitrógeno o fosfato; las cuales son situaciones semejantes a las que desencadenan la respuesta estricta (Cashel *et al.*, 1996). Las cepas (p)ppGpp⁰ tienen algunas características en común con las mutantes *rpoS*, pero con efectos menos marcados, tienen viabilidad reducida en estado estacionario, células elongadas, susceptibilidad a no sobrevivir a la reducción drástica de la temperatura y mayor sensibilidad a la salinidad (Jones *et al.*, 1992; Van Bogelen y Neidhart, 1990; Xiao *et al.*, 1991). La presencia de (p)ppGpp regula positivamente la presencia de *rpoS*,

y con proteínas *relA* o *spoT* truncadas que aumentan los niveles de (p)ppGpp se puede inducir a la proteína RpoS. Más que la concentración de (p)ppGpp, su presencia es la que parece influir en la síntesis del factor sigma de estado estacionario (Gentry *et al.*, 1993). Es posible que la entrada al estado estacionario sea una suma de efectos de la presencia de (p)ppGpp y de proteínas requeridas para la entrada en fase de crecimiento de estado estacionario (Gentry *et al.*, 1993). La dependencia de estado estacionario y la respuesta estricta no se observa en todas las bacterias, pues las proteobacterias del grupo ϵ no tienen factor sigma S, pero su fase estacionaria se afecta por la mutación de la respuesta estricta (ver adelante) (Gaynor *et al.*, 2005).

Resistencia a antibióticos y respuesta estricta

La mutantes (p)ppGpp⁰ de *E. coli* tienen una menor resistencia a los antibióticos, dichas mutantes presentan concentraciones mínimas de inhibición que son hasta 1/8 de la concentración inhibitoria mínima de las cepas silvestres (Greenway y England, 1999). El fenómeno de disminución de resistencia a antibióticos se considera consecuencia de los cambios de estructura y composición asociados a la reducción del crecimiento, pues la variación fina de las concentraciones celulares de (p)ppGpp no la altera (Greenway y England, 1999). La alteración en la expresión del factor sigma S (σ^S) de la RNA polimerasa es importante para el fenotipo de reducción de resistencia a los antibióticos; ya que las mutantes de *rpoS* (σ^S) tienen la misma reducción de resistencia a antibióticos que las dobles mutantes $\Delta relA \Delta spoT$ ((p)ppGpp⁰) en fondos isogénicos (Brown y Williams, 1985; Greenway y England, 1999; Wright y Gilbert, 1987).

El único antibiótico directamente relacionado con la respuesta estricta es la rifampicina, ya que se considera que su sitio de unión a la RNA polimerasa podría estar cerca del sitio de

unión a (p)ppGpp, o que la interacción de (p)ppGpp con la RNA polimerasa provoca un cambio conformacional que impide la unión del antibiótico (Reddy *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2002).

Producción de metabolitos secundarios

En las bacterias del género *Streptomyces* se buscó la relación de la producción de (p)ppGpp y la producción de metabolitos secundarios. En *S. coelicolor* A3(2) la producción de estos metabolitos sólo se obtiene después de la síntesis de (p)ppGpp por limitación de nutrientes (paso de medio rico a medio pobre), es probable que el efecto se deba al cambio de fase del desarrollo más que a la producción de (p)ppGpp *per se* (Strauch *et al.*, 1991). En otro estudio se describe que la producción de antibióticos está relacionada a la velocidad del crecimiento o la detención del crecimiento y que la mutación del gen *relA* no tiene efecto sobre su producción. (Chakraborty *et al.*, 1996).

Caracterización de la respuesta estricta en otras bacterias

Streptococcus equisimilis

En esta bacteria hay un solo gen para la respuesta estricta. Para su caracterización, el gen se expresó en una doble mutante *relA* y *spoT* de *E. coli*, encontrándose que en este fondo genético la proteína funciona como SpoT pero no como RelA. Sin embargo, cuando los ribosoma de *S. equisimilis* se aislaron, se pudo observar que la proteína también tiene actividad de RelA (Mechold *et al.*, 1996). Eso muestra que utilizar el sistema *E. coli* puede dar una clara idea de la pertenencia de una proteína al grupo RelA/SpoT, pero no puede brindar datos exactos sobre su actividad (Mechold *et al.*, 1996). Lo anterior porque los ribosomas pueden tener conformaciones diferentes en los distintos grupos de bacterias (Mechold *et al.*, 2002). En el trabajo con la proteína aislada se observó que el dominio carboxilo terminal se

encarga de las funciones de regulación de la actividad de la proteína y que alterar la secuencia de la proteína con aminoácidos tales como las colas de histidina que permiten purificar proteínas, alteran su regulación (Mechold *et al.*, 2002).

Mycobacterium tuberculosis

Esta bacteria posee solo una proteína homóloga a las proteínas de la respuesta estricta, nombrada *rel*_{MTu}. La proteína de *M. tuberculosis* no sintetiza (p)ppGpp cuando a los cultivos se les agrega hidroxamato de serina; no se descarta que las micobacterias posean un metabolismo de aminoácidos diferente al de otras bacterias o que sean impermeables al compuesto (Primm *et al.*, 2000). La mutante *rel*_{MTu} tiene una disminución de la velocidad de crecimiento en diversos medios de cultivo, es termosensible a 42 °C y pierde viabilidad hasta en 4 órdenes de magnitud con respecto a la cepa silvestre cuando se le limita de nutrientes o se coloca en condiciones hipo-oxigénicas. La mutante *rel*_{MTu} tiene capacidad de infectar macrófagos humanos, pero no produce infecciones persistentes en ratones, sugiriendo que la respuesta estricta es necesaria para la adaptación a largo plazo de la bacteria (Primm *et al.*, 2000). La proteína Rel_{MTu} purificada sintetiza (p)ppGpp de manera independiente de ribosomas y de tRNA, y degrada (p)ppGpp de manera dependiente de Mn²⁺, pero en células de *E. coli* el gen *rel*_{MTu} funciona como *relA*. Es posible que la limitación de oxígeno, aminoácidos y fuente de carbono lleven a la bacteria a un estado latente y que la proteína Rel_{MTu} responda a ese estímulo (Avarbock *et al.*, 1999).

Corynebacterium glutamicum

Tienen solo una proteína capaz de complementar la mutación de *relA* en *E. coli*, se propone que la enzima es bifuncional, pero no se tienen evidencias experimentales (Wehmeier *et al.*, 1998).

Vibrio sp.

En la cepa marina S14 se encuentran un gen *relA*, y otro homólogo a *spoT* que se denomina *csrS*. La mutante *relA* no sintetiza (p)ppGpp si se le limita de aminoácidos, y presenta un fenotipo de control relajado de RNA en esas condiciones. Se considera que el gen *csrS* funciona como un gen *spoT* debido a que la mutante *relA* sometida a limitación de fuente de carbono no sintetiza (p)ppGpp al principio, pero después alcanza niveles normales del compuesto. La mutación del gen *relA* no afecta la capacidad de sobrevivencia a largo plazo de la bacteria (Flårdh *et al.*, 1994). En experimentos con geles de electroforesis bidimensional de proteínas se encontró un regulón para la limitación de carbono cuya expresión es controlada por los genes *relA* y *csrS*, se considera que *csrS* podría producir una señal complementaria al (p)ppGpp durante la limitación de carbono (Östling *et al.*, 1996).

La especie *Vibrio cholerae* tiene dos genes para la respuesta estricta: el gen *relA* es claramente para la síntesis de (p)ppGpp ante la falta de aminoácidos, pero el otro gen, homólogo a *spoT* parece codificar para hidrolasa y probablemente para sintetasa aunque no ha sido descrita su actividad. La mutación del gen *relA* tiene implicaciones en el comportamiento infeccioso de la bacteria, pues la movilidad de la mutante está disminuida, la producción de los factores de virulencia *in vitro* e *in vivo* está reducida y presenta una severa atenuación de la capacidad de colonización de estómago de ratón infante como consecuencia de la reducción de la producción del factor de colonización (Haralalka *et al.*, 2003). El efecto en los genes de virulencia se debe a una transcripción reducida de los genes *toxT* y *toxR* que son reguladores de los genes de la toxicidad en esta especie (Haralalka *et al.*, 2003).

Bacillus subtilis

Las especies de *Bacillus* tienen un solo gen para síntesis y la degradación de (p)ppGpp, ese gen se conoce como Rel. Se considera que en otras bacterias gram positivas existe solo un gen homólogo al de *B. subtilis* (Mittenhuber, 2001). Hay un reporte que liga a la respuesta estricta con la respuesta al estrés de la bacteria *B. subtilis*. En esa especie, hay un regulón de estrés que se expresa cuando la bacteria se expone a estrés físico (calor, ósmosis, etanol) o nutricional (limitación de fosfato, glucosa o tratamiento con azida de sodio) (Hecker *et al.*, 1996). El regulón de estrés está controlado por el estado de activación del factor sigma B (σ^B) de la RNA polimerasa. El factor σ^B permanece inactivo porque está unido a la proteína RsbW, una vez que la bacteria es estresada, la proteína RbsW se despega del factor sigma que entonces se activa y puede unirse a la RNA polimerasa (Yang *et al.*, 1996). El (p)ppGpp tiene un papel indirecto en la activación del factor sigma B: cuando se aumentan las concentraciones de (p)ppGpp por la limitación de aminoácidos a los cultivos, no se activa el factor sigma B, mientras que durante la limitación de glucosa, la síntesis de (p)ppGpp modifica las concentraciones de GTP/GDP que son utilizadas como señal para la activación del factor alternativo (Zhang y Haldenwang, 2003). La reducción de las concentraciones de GTP/GDP son observadas durante la inducción de la esporulación, en ese fenómeno participa también la proteína Rel (López *et al.*, 1981).

Campylobacter jejuni

La bacteria es un parásito intestinal causante de gastroenteritis, que pertenece al grupo ϵ de las proteobacterias, en el genoma de la bacteria solo existe un gen *rsh*. En un estudio de microarreglos de DNA se encontró que un gen que codifica para una proteína Rsh es expresado en mayores niveles durante la infección de células epiteliales (Gaynor *et al.*, 2005). La mutante *rsh* de *C. jejuni* no puede sintetizar (p)ppGpp en respuesta a la limitación de

nutrientes y tiene afectadas diversas funciones entre ellas la sobrevivencia en fase estacionaria y el crecimiento en condiciones de alta concentración de oxígeno. La respuesta estricta en *C. jejuni* es también necesaria para la virulencia, la adhesión y la sobrevivencia en células de epitelio humano. Es interesante que en *C. jejuni* carece de factor sigma S, pues esto implica que la respuesta estricta en esa bacteria no tiene la participación de ese factor de transcripción observada en *E. coli* (Gaynor *et al.*, 2005).

Rhodobacter capsulatus

Esta bacteria pertenece al orden de las *Rhizobiales* y tiene un solo gen *rsh*. Hasta antes del estudio de su respuesta estricta se consideraba que solo las bacterias gram positivas poseían solo un gen para la respuesta estricta (Mittenhuber, 2001). La secuencia de la proteína *rsh* de *R. capsulatus* tiene mayor porcentaje de identidad con las proteínas SpoT (Masuda y Bauer, 2004). Un análisis de varias secuencias de genes *rsh* mostraron que la división α de las proteobacterias forma una rama nueva en el árbol de secuencias Rel (Mittenhuber, 2001; Masuda y Bauer, 2004) (figura 2). La delección del gen *rsh* en *R. capsulatus* es letal, pero puede ser obtenida en un fondo genético sin la proteína del nucleoide HvrA (Masuda y Bauer, 2004). El resultado anterior es sumamente interesante, pues muestra la acción conjunta de la respuesta estricta con el super enrollamiento del DNA; la proteína nucleoide HvrA es necesaria para la expresión de los genes utilizados para la fotosíntesis, los genes de la fijación de nitrógeno, la ubiquinol reductasa y la citocromo oxidasa en *R. capsulatus* (Kern *et al.*, 1998; Swem and Bauer, 2002).

Myxococcus xanthus

Myxococcus xanthus es una bacteria de suelo que tiene comportamiento cooperativo social y desarrollo multicelular. Las condiciones ambientales que limitan el crecimiento de las

bacterias resultan en la producción de un tipo de esporas (mixosporas) que resisten al estrés. En el desarrollo de las mixosporas se utilizan señales de autoreconocimiento, morfogénesis espacial, uso de células especializadas y señales intercelulares. En el proceso de desarrollo participa activamente la respuesta estricta.

Las mixobacterias son bacterias depredadoras, su principal fuente de carbono, energía y nitrógeno son los aminoácidos que obtienen de la fracción proteica de la bacterias predadas (Dworkin, 1962). El desarrollo de esporas culmina con un 10 a 20% de células que se convierten en esa forma de resistencia, aproximadamente un 10% de células que se especializan a células periféricas que posiblemente inhiben la destrucción de las colonias por otras bacterias, y cerca de un 80% de las bacterias se autolisan (Wireman y Dworkin, 1977).

Cuando a *M. xanthus* se le limita de aminoácidos debe decidir si las fuentes que tienen a su alcance se utilizan para crecer o para el desarrollo de esporas, para ello cuenta con tres sistemas.

- a) Medir la limitación con la respuesta estricta.
- b) Emitir señales de quorum
- c) Detener, o continuar el crecimiento con proteínas específicas

La limitación de aminoácidos provoca la producción de (p)ppGpp por la proteína RelA (respuesta estricta). El aumento de las concentraciones de (p)ppGpp induce la síntesis y exportación de un grupo de proteasas que hidrolizan proteínas de superficie. Al ser hidrolizadas las proteínas de superficie se aumenta la concentración extracelular de aminoácidos que se conocen como la señal A y en consecuencia se activa la transcripción de los genes *asgA*, *asgB* y *asgC* que sirven para el inicio del desarrollo de esporas (Crawford y Shimkets, 2000).

La señal A es una señal doble, por una parte es señal de limitación de aminoácidos, pero por la otra, por si misma constituye una fuente de carbono. Para resolver un potencial problema, la respuesta estricta activa la transcripción del gen *csgA* e inhibe la del gen *socE*. Si el balance entre CsaA y SocE favorece a CsgA, se detiene el crecimiento y se asegura que los aminoácidos de la señal A se utilicen para el desarrollo de esporas; en caso contrario, las bacterias continúan creciendo (Shimkets, 1999). La sobreproducción de (p)ppGpp no regulada inicia el proceso de desarrollo de esporas (Shimkets, 1999).

La respuesta estricta en *Rhizobium*

Las cepas 41 y 1021 de *S. meliloti*, *R. tropici* y *Azorhizobium caulinodans* fueron sometidas a limitación de aminoácidos con adición de hidroxamato de serina y se describe que solo la cepa 1021 de *S. meliloti* es capaz de sintetizar (p)ppGpp en esas condiciones, si bien los extractos proteicos de *A. caulinodans* reaccionan con anticuerpos anti RelA (Howorth y England, 1999). En un trabajo anterior (Belistky y Kary, 1982) se describió que la cepa 41 *S. meliloti* puede sintetizar (p)ppGpp después de una limitación extrema de carbono.

Sinorhizobium meliloti

En esta bacteria (cepa 1021) se describió una mutante en un gen *rsh* (al que se le denominó *relA*), una búsqueda de homólogos en el genoma de *S. meliloti* solo arroja un gen con esas características y presenta al dominio HD, por lo que es de esperarse que degrade (p)ppGpp y que la etiqueta RelA no sea correcta. Por otra parte, la producción de (p)ppGpp se obtuvo experimentalmente al transferir las células bacterianas de medio rico a medio mínimo sin fuente de carbono (Wells y Long, 2003). El fenotipo de la mutante es que no nodula porque sobreproduce succinoglicano y los pocos nódulos que forma no fijan nitrógeno (Wells y Long, 2002). Aparte de que la mutante requiere de metionina, glutamato, arabinosa y succinato en el

medio rico, no se detalla su comportamiento fisiológico. En otro trabajo se presenta evidencia de que algunas mutaciones en subunidades de la RNA polimerasa son capaces de revertir el efecto de la mutación de la respuesta estricta (Wells y Long, 2003).

JUSTIFICACIÓN

La simbiosis *Rhizobium* leguminosas se sustenta en un intercambio carbono-nitrógeno, por lo tanto, el metabolismo de esos elementos es sumamente importante para comprender el proceso. Los aminoácidos participan en el metabolismo de carbono y nitrógeno y de ahí la importancia de estudiarlos. En *Rhizobium* aún no ha sido estudiada con el suficiente detenimiento la regulación de la utilización de los aminoácidos. Si bien se han estudiado las vías metabólicas por las que algunos de ellos se degradan o sintetizan, en particular las de los aminoácidos que se acumulan en los bacteroides durante la fijación de nitrógeno y los sintetizados durante la asimilación de amonio. Hace falta llegar a una visión mas clara de cómo es que se regula el metabolismo conjunto de los aminoácidos. Sobre la regulación de la utilización de aminoácidos en *Rhizobium*, conocemos poco, por ejemplo en *R. etli*, la degradación de los aminoácidos, así como la del nitrato son independientes de la actividad de la proteína NtrC (Moreno *et al.*, 1992), pero la degradación de nitrato y la degradación de los aminoácidos alanina y serina dependen de la actividad de uno de los factores sigma 54 de la RNA polimerasa (gen *rpoN1*) (Michiels *et al.*, 1998a).

Los resultados experimentales de diversos grupos de trabajo, lejos de esclarecer el papel de los aminoácidos en la simbiosis, han construido un conjunto de nuevas interrogantes. Por un lado, en la membrana peribacteroidal no se han encontrado transportadores para aminoácidos de la afinidad necesaria para justificar un intercambio de aminoácidos (Wittehead *et al.*, 1998). Pero una mutante de *R. leguminosarum* incapaz de transportar aminoácidos por tener mutados los genes que codifican para dos transportadores de aminoácidos (*bra* y *aap*), establece una relación simbiótica en la que los bacteroides fijan nitrógeno, pero las plantas están limitadas de nitrógeno; sugiriendo un papel activo del transporte de aminoácidos en la

simbiosis (Lodwig *et al.*, 2003). Cada vez existen mas evidencias que apuntan en el sentido de que, mas que el transporte de los aminoácidos a través de la membrana peribacteroidal, lo importante para la simbiosis puede ser el control de las concentraciones de compuestos de carbono y de carbono-nitrógeno mediante reacciones de transaminación (Allaway *et al.*, 2000; Patriarca *et al.*, 2002).

La transformación de bacteria a bacteroide se describía en función de pocos pasos metabólicos, pero existen evidencias de que es un proceso espacio temporal, y de que existe un programa de regulación genética para modificar la fisiología y el metabolismo de la bacteria (Patriarca *et al.*, 2002). Se ha sugerido que uno de los eventos importantes para ese control podría ser la adaptación a un cambio de fuente de energía, pasando de utilizar predominantemente aminoácidos en el hilo de infección, a utilizar dicarboxilatos cuando la bacterias son endocitadas por las células vegetales (Patriarca *et al.*, 2002). Cada vez se conocen más cambios metabólicos y de expresión genética durante la formación de los simbiosomas, pero falta estudiar mutantes bacterianas carentes de capacidad de adaptación a la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, que permitan conocer el papel de dichos cambios nutricionales. La adaptación metabólica de los bacteroides probablemente depende de señales, esas señales se desconocen, lo mismo que su proceso de transducción.

El conocimiento de la regulación metabólica en las bacterias del género *Rhizobium* es escaso, descontando la que opera para asimilar amonio. Siendo la formación de los nódulos un proceso complejo, es de esperarse que una red de regulación integre varias actividades metabólicas durante la interacción planta-bacteria. Dicha red debe incluir efectos metabólicos, modificación de la estructura del DNA, modificación de la expresión genética y cambios en la

estructura de la bacteria como programa independiente o resultado de los demás cambios. Su estudio se espera complejo.

El fenotipo de una mutante de *R. etli* (LM01) obtenida por mutagénesis con el transposón Tn5-*mob* y seleccionada por su incapacidad de utilizar glutamina, que presentó un fenotipo pleiotrópico que incluye incapacidad para la degradación de otros aminoácidos, incapacidad de utilizar nitrato, reducción de la producción de nódulos en plantas de frijol y pérdida de la actividad de reducción de acetileno (fijación de nitrógeno); hacía interesante valorar la relación entre esos aspectos del metabolismo aparentemente no ligados. La mutante LM01 de *R. etli* representaba un rompecabezas intelectual cuya solución incluía diversas posibilidades como: que el fenotipo se debiera a la pérdida de una función del metabolismo central; que el fenotipo resultara de una mutación asociada a un supresor y/o a la presencia de varias mutaciones; que el fenotipo fuese producto de una mutación “leaky”, etc. La solución del problema –sin embargo- presentaba también la oportunidad de encontrar un regulador que diera importancia al metabolismo de este grupo de bacterias. Con ese propósito se realizó el proyecto.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a la mutante LM01 de *R. etli*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Obtener la secuencia del gen afectado en la mutante LM01 de *R. etli*.

Cuantificar la actividad de la proteína mutada en la mutante LM01 de *R. etli*.

Obtener una nueva mutante del *R. etli* afectada en el mismo gen que la mutante LM01.

Comparar fenotípicamente ambas mutantes.

Buscar como se encuentra la relación simbiótica en las mutantes.

HIPÓTESIS

El fenotipo de la mutante LM01 de *R. etli* está asociada a un solo *locus*; por lo tanto, en esta bacteria existe una coordinación de la utilización de fuentes de nitrógeno, la nodulación y la fijación de nitrógeno.

"*De plantis libri tres*, maledizione non é questo," diceva Guglielmo e buttava il libro sul tavolo.
"Thesaurus herbarum," dicevo io, e Guglielmo: "Lascia stare, cerchiamo un libro greco!"
"Questo?" chiedevo io mostrandogli un'opera dalle pagine coperte dei caratteri astrusi. E Guglielmo:
"No, questo é arabo, sciocco! Aveva ragione Bacone che il primo dovere del sapente é studiare le lingue!"
"Ma l'arabo non lo sapete neppure voi!" ribattevo piccato, al que Guglielmo mi rispondeva:
"Ma almeno capisco quando é arabo!" E io arrossivo perché udivo Bencio ridere alle mie spalle.
Il nome della Rosa, Umberto Ecco

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se encuentran en el artículo que se incluye a continuación

Arturo Calderón-Flores, Gisela Du Pont, Alejandro Huerta-Saquero, Horacio Merchant-Larios, Luis Servín-González and Socorro Durán. (2005). The stringent response is required for amino acid and nitrate utilization, Nod factor regulation, nodulation and nitrogen fixation in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **187**:5075-5083.

The Stringent Response Is Required for Amino Acid and Nitrate Utilization, Nod Factor Regulation, Nodulation, and Nitrogen Fixation in *Rhizobium etli*†

Arturo Calderón-Flores,¹ Gisela Du Pont,¹ Alejandro Huerta-Saquero,¹
Horacio Merchant-Larios,² Luis Servín-González,¹ and Socorro Durán^{1*}

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología¹ and Departamento de Biología Celular y Fisiología,²
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,
México D. F. 04510, Mexico

Received 2 February 2005/Accepted 11 May 2005

A *Rhizobium etli* Tn5 insertion mutant, LM01, was selected for its inability to use glutamine as the sole carbon and nitrogen source. The Tn5 insertion in LM01 was localized to the *rsh* gene, which encodes a member of the RelA/SpoT family of proteins. The LM01 mutant was affected in the ability to use amino acids and nitrate as nitrogen sources and was unable to accumulate (p)ppGpp when grown under carbon and nitrogen starvation, as opposed to the wild-type strain, which accumulated (p)ppGpp under these conditions. The *R. etli rsh* gene was found to restore (p)ppGpp accumulation to a $\Delta relA \Delta spoT$ mutant of *Escherichia coli*. The *R. etli* Rsh protein consists of 744 amino acids, and the Tn5 insertion in LM01 results in the synthesis of a truncated protein of 329 amino acids; complementation experiments indicate that this truncated protein is still capable of (p)ppGpp hydrolysis. A second *rsh* mutant of *R. etli*, strain AC1, was constructed by inserting an Ω element at the beginning of the *rsh* gene, resulting in a null allele. Both AC1 and LM01 were affected in Nod factor production, which was constitutive in both strains, and in nodulation; nodules produced by the *rsh* mutants in *Phaseolus vulgaris* were smaller than those produced by the wild-type strain and did not fix nitrogen. In addition, electron microscopy revealed that the mutant bacteroids lacked poly- β -hydroxybutyrate granules. These results indicate a central role for the stringent response in symbiosis.

Rhizobia are soil bacteria able to colonize the roots of compatible legumes under conditions of nitrogen limitation (31, 39, 46). This symbiotic interaction leads to the formation of organelle-like structures called nodules in the plant roots, in which these bacteria differentiate into N₂-fixing forms known as bacteroids (31, 46). Bacteroids in the nodules are surrounded by the plant cell membrane, called the peribacteroid membrane (31, 42). Bacteroids, the peribacteroid space, and the peribacteroid membrane are also referred to as symbiosomes (38). In the process of symbiosome formation, free-living rhizobia move from a variable environment to a more controlled one inside the plant cells by adapting in succession to three different environments: the rhizosphere, the infection thread (IT), and the plant cell cytoplasm (31, 39, 42). Bacteroid differentiation is accompanied by the loss of bacterial cell division and by a switch from a metabolism dedicated to ammonium assimilation to one dedicated to nitrogen fixation (33, 44).

The study of rhizobial metabolic networks that lead to productive nodules is clearly of importance for understanding the symbiotic process. Diverse studies have implicated amino acid metabolism in the bacterial adaptation to nodule conditions, as well as in the metabolic interchange between plant and bacte-

roids in fully developed nodules (7, 16, 20, 33, 34). The rhizobial metabolic adaptations required for using amino acids inside the IT and ammonium excretion in these circumstances could function as a signal to uncouple ammonium assimilation and nitrogen fixation, which is necessary for symbiosome formation in *Rhizobium etli* (33). During this process, the NtrC protein disappears (32), and expression of *amtB*, encoding the ammonium transporter, is down-regulated (43). It is also possible that early ammonium excretion by bacteroids into the IT plays a role in turning on the plant genetic program for nodule formation (33). It has been reported that the *R. etli ntrC* gene is not necessary for the utilization of amino acids or nitrate as nitrogen sources (30); how *R. etli* regulates amino acid utilization, the role of this regulation in general metabolism, and its interaction with nitrogen fixation are not known.

The stringent response is a global regulatory system that allows bacteria to adapt to amino acid and/or carbon starvation (5). The stringent response is mediated through the synthesis of guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate, collectively named (p)ppGpp (5). In *Escherichia coli*, amino acid starvation leads to an increase of uncharged tRNA molecules that activate the ribosome-dependent synthesis of (p)ppGpp by the RelA enzyme; in this circumstance, the SpoT protein is responsible for (p)ppGpp hydrolysis (5). SpoT is a bifunctional enzyme that is also capable of (p)ppGpp synthesis in response to carbon deficiency (12, 49). Three classes of bacterial RelA/SpoT orthologs have been described: (i) (p)ppGpp synthetase I or RelA, which synthesizes (p)ppGpp only after amino acid limitation; (ii) (p)ppGpp synthetase II, which synthesizes (p)ppGpp in response to carbon limitation;

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, México D.F. C.P. 04510, México. Phone: 52 (55) 56-22-38-80. Fax: 52 (55) 56-22-38-55. E-mail: sduranv@servidor.unam.mx.

† This work is dedicated to the memory of Jorge Calderón.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Reference or source
Strains		
<i>R. etli</i>		
CE3	Sm ^r Nal ^r derivative of wild-type strain CFN42	40
LM01	<i>rsh::Tn5</i> , Km ^r derivative of CE3	This work
AC1	<i>rsh::Ω</i> , Sp ^r derivative of CE3	This work
<i>E. coli</i>		
CF1648	Wild-type K-12 strain [MG1655]	49
CF1652	Δ <i>relA251::kan</i> derivative of CF1648	49
CF1693	Δ <i>spoT207::cat</i> derivative of CF1652	49
S17-1	<i>recA endA thi hsdR RP-2-Tc::Mu::Tn7 Tp^r Sm^r</i>	41
HB101	F ⁻ <i>hsdS20 recA13</i> Sm ^r	3
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ(lac-proAB)/F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	50
Plasmids and cosmids		
pLAFR1	Broad host range, cosmid cloning vector; Tc ^r	8
pRK2073	ColE1 <i>mob⁺ tra⁺</i> ; Sp ^r . Helper plasmid.	19
pRP30	<i>R. etli nodA::MudIIPR13</i> , cloned in pSUP205; Tc ^r , Cm ^r	47
pUC18	Cb ^r	50
pMMB206	Expression vector; Cm ^r	29
pJQ200	Suicide vector; Gm ^r , <i>sacB</i>	37
pSUP5011	<i>Tn5-mob</i> in pBR325; Km ^r , Cb ^r	41
pMGD4	Derivative of pLAFR1 selected from a cosmid library for its ability to complement mutant LM01; Tc ^r	This work
pMGD44	Derivative of pLAFR1 with two contiguous EcoRI fragments, subcloned from pMGD4, that complement LM01 and AC1 mutants; Tc ^r	This work
pMGD2234	2,234-bp EcoRI fragment of pMGD44 subcloned in pLAFR1; Tc ^r	This work
pMGD2203	2,203-bp EcoRI fragment of pMGD44 subcloned in pLAFR1; Tc ^r	This work
pMGD44-Ω-14	Insertion of Ω element in the central EcoRI site of pMGD44; Tc ^r , Sp ^r	This work
pAC3	LM01 EcoRI fragment carrying the <i>Tn5</i> insertion cloned in pUC18; Cb ^r , Km ^r	This work
pAC7	pMGD2234 insert subcloned in pUC18; Cb ^r	This work
pAC39	Ω insertion in EcoRV site of pAC7; Cb ^r , Sp ^r	This work
pAC40	pAC39 insert cloned in pJQ200; Gm ^r , Sp ^r , <i>sacB</i>	This work
pAC50	<i>R. etli rsh</i> gene cloned into BamHI-HindIII sites of pMMB206; Cm ^r	This work

and (iii) (p)ppGpp synthetase III, which synthesizes (p)ppGpp after both carbon and amino acid limitation (28). Genes encoding proteins homologous to RelA and SpoT (collectively known as *rsh* genes) have also been found in plants, where they have been implicated in the regulation of chloroplast gene expression in response to plant defense signals (11).

In order to investigate the role of amino acid utilization in *R. etli* during its symbiosis with *Phaseolus vulgaris*, we searched for *R. etli* mutants specifically altered in the utilization of amino acids, either as nitrogen sources or as carbon and nitrogen sources. In this paper, we describe the isolation of a mutant altered in the utilization of amino acids as sole carbon and nitrogen sources. This mutant showed reduced nodulation ability and was impaired in nitrogen fixation. These effects were caused by a mutation in the *R. etli rsh* gene, which encodes a homolog of RelA and SpoT proteins, involved in the stringent response in other organisms.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and media. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *R. etli* was grown at 30°C in peptone-yeast (PY) complex medium (5 g/liter peptone, 3 g/liter yeast extract, and 7.0 mM CaCl₂) or in minimal medium (MM) (1.2 mM K₂HPO₄, 0.4 mM MgSO₄ · 7H₂O, 1.5 mM CaCl₂, 0.0005% FeCl₃ · 6H₂O [pH 6.8]). MOPS-MM contains the same salts as MM, except KH₂PO₄ was used at 0.4 mM (0.2 mM for labeling experiments); MOPS-MM also contains 0.4 M MOPS (morpholinepropanesulfonic acid), 0.04 M Tricine, 1 mg/ml biotin, and a solution of microelements (4). Succinate,

glucose, mannitol, and sucrose were used at 10 mM as carbon sources, whereas glycerol was used at 2%. Ammonium chloride, potassium nitrate, or amino acids were used as nitrogen sources, all at 10 mM. When used as the sole carbon and nitrogen source, amino acids were added at 10 mM. *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani complex medium. For determination of the utilization of nitrogen sources, colonies were replica plated onto M9 minimal medium plates and incubated at 30°C. Glucose (0.2%) was used as the carbon source and ammonium, aspartate, or glutamine as nitrogen sources, all at a 10 mM final concentration.

Antibiotics for *R. etli* cultures were used at the following final concentrations (in μg/ml): tetracycline (Tc), 10; nalidixic acid (Nal), 20; streptomycin (Sm), 200; kanamycin (Km), 30; spectinomycin (Sp), 200; chloramphenicol (Cm), 15; and gentamicin (Gm), 15. Antibiotics for *E. coli* cultures were used at the following concentrations (in μg/ml): Km, 30; Tc, 10; Cm, 20; Sp, 200; carbenicillin (Cb), 150; and Gm, 25.

Growth rate determination. For kinetic studies, *R. etli* cultures were grown overnight at 30°C in 250-ml Erlenmeyer shake flasks containing 100 ml of PY medium. Cells were collected by centrifugation at 6,000 × g at 4°C, washed with sterile MM salts, and used to inoculate 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of MM to an optical density at 540 nm (OD₅₄₀) of 0.05. Cultures were incubated at 30°C with shaking at 200 rpm. Samples were taken at 0, 4, 8, 12, and 24 h, and the protein content of the cultures was determined by the Lowry et al. method (21).

Tn5 general mutagenesis of *R. etli* and selection of mutant strain LM01. The pSUP5011 suicide plasmid (41), which carries the *Tn5-mob* transposon, was introduced by conjugation into the *R. etli* wild-type strain CE3. Kanamycin-resistant cells were pooled and resuspended in MM containing glutamine as the sole carbon and nitrogen source and 200 μg/ml ampicillin as previously described (6). Surviving cells were washed and plated in PY medium, and isolated colonies were replicated onto MM-succinate-ammonium and MM-glutamine plates to identify those unable to use glutamine as the carbon and nitrogen source.

Rapid plate assay for the *E. coli* relaxed phenotype. Stringent or relaxed *E. coli* phenotypes were determined by a rapid method; cells were streaked on SMG plates (45), which contain serine, methionine, and glycine (each at 100 µg/ml), and incubated at 37°C until wild-type strain colonies were formed and then at 30°C for a viability test (45).

Cloning of the LM01 Tn5 insertion. Total DNA from the LM01 mutant was digested with EcoRI and ligated to EcoRI-cut pUC18. *E. coli* cells were transformed with the ligation and plated on Luria-Bertani plates with Cb and Km to select colonies in which the chromosomal EcoRI fragment with the Tn5 insertion had been cloned.

Plasmid and cosmid conjugation. Plasmids were introduced by transformation into the helper *E. coli* strain S17-1, as reported previously (15), which was then conjugated with *R. etli*. Crosses were incubated at 30°C overnight in PY medium plates; cells were harvested, washed, plated onto PY plates with the appropriate antibiotics, and incubated at 30°C. Cosmids from an *R. etli* genomic library maintained in *E. coli* HB101 were introduced by conjugation into the LM01 mutant by triparental crosses (6). After overnight incubation, cells were plated in selective media and incubated at 30°C until colonies appeared.

Construction of the *rsh::Ω* AC1 strain. pAC7 was obtained by cloning the 2,234-bp EcoRI fragment of pMGD2234 (containing the 5' region of the *R. etli rsh* gene) into the EcoRI site of pUC18; the Ω element (36) was obtained from pMW157 by SmaI digestion and cloned into the unique EcoRV site of pAC7, located at codon 91 of the *R. etli rsh* gene, to form pAC39. The pAC39 insert was then cloned into the suicide vector pJQ200 that had been partially digested with EcoRI. Plasmids that carried the pAC39 insert in the polylinker EcoRI site were distinguished from those where the insert had been cloned in the EcoRI site located inside *sacB* by their sucrose-sensitive phenotype. The plasmid thus obtained, pAC40, was introduced by conjugation into the wild-type *R. etli* strain CE3. Double recombinants were selected in PY medium with 5% sucrose, Nal, and Sp and checked for Gm sensitivity. One such strain was selected (AC1), and the insertion was confirmed by Southern blotting.

DNA experiments. DNA and cloning experiments were carried out by standard procedures (23). Restriction enzymes, *Taq* DNA polymerase, and T4 DNA ligase were purchased from Amersham. DNA sequences were obtained in an ABI PRISM model 310, version 3.0 automated DNA sequencer.

Cloning the *R. etli rsh* structural gene in the expression vector pMMB206. PCR was used to amplify the *rsh* gene from *R. etli* CE3 DNA, using the oligonucleotides Relbam5 (GCAGGATCCATGATGCGGCAGTACGCG) and Relhind3 (ATCAAGCITCTACTCATAGAGTCGTCG), which introduce BamHI and HindIII sites (underlined), respectively. The PCR product was digested with BamHI and HindIII and cloned into the polylinker of pMMB206; this plasmid was named pAC50 (Table 1).

Plant experiments. *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa seeds were surface sterilized with a 5% sodium hypochlorite solution and germinated; groups of six seedlings were grown in pots with sterile vermiculite as support and inoculated as described previously (6). Nodules were collected 28 days after inoculation and dried in an oven for 48 h at 80°C. Some nodules were treated with sodium hypochlorite and crushed onto PY plates with appropriate antibiotics; isolated colonies were replicated onto MM plates to determine their phenotype. Nitrogenase activity was measured by acetylene reduction as reported previously (6). For dry weight measurements, plants were collected 50 days after inoculation and dried in an oven, without roots, for 48 h at 80°C.

Determination of *nod* promoter activity. Plasmid pRP30, which carries a *nodA-lacZ* fusion, was used (47). Cultures were grown in MM with 10 mM succinate as the carbon source and 5 mM ammonium as the nitrogen source; 1.2 µM naringenin was added at the time of inoculation. β-Galactosidase activity was determined as Miller units after 12 h (27).

Nod factor determination. Nod factors were determined in supernatants of cultures labeled with [1-¹⁴C]glucosamine (Amersham) by thin-layer chromatography (TLC) in silica gel plates (18). Naringenin was used as a *nod* gene inductor at 1.2 µM.

(p)ppGpp determination in *E. coli* cells. For (p)ppGpp determination in *E. coli* cells, cultures were uniformly labeled with [³²P]H₃PO₄ (4); 100-µl cultures were grown in microtiter plates (catalog no. 001-010-2201; Dynatech Laboratories, Inc.). Cultures for determination of ribosome-dependent (p)ppGpp synthesis were grown overnight in MOPS-MM with 40 µg/ml of each amino acid and 0.2% glucose, collected by centrifugation, and used to inoculate 100 µl of the same medium (OD₆₀₀ of 0.05) without serine and with 0.5 g/ml serine hydroxamate and 300 µg/ml valine. When the OD₆₀₀ reached approximately 0.25, [³²P]H₃PO₄ (no. 64014L; ICN Biomedical) was added to 100 µCi/ml (4). To elicit the stringent response by carbon source starvation, cells were grown overnight in MOPS-MM with 0.02% glucose, collected by centrifugation, and inoculated in fresh medium (OD₆₀₀ of 0.15). [³²P]H₃PO₄ was added at the time of inoculation

(100 µCi/ml), and incubation was continued in a microtiter plate at 30°C and 200 rpm (4). At appropriate intervals, 10 µl of each culture was transferred to a microtiter plate containing 10 µl of dry ice-chilled 14 N formic acid. When all samples were ready, they were thawed and refrozen twice or left on ice for at least 15 min; 5 µl of each sample was spotted in cellulose-polyethyleneimine TLC plates (Sigma-Aldrich) and developed in 1.5 M KH₂PO₄, pH 3.4. TLC plates were air dried and exposed to X-ray films.

(p)ppGpp determination in *R. etli* cells. For amino acid starvation experiments, *R. etli* cultures were grown in MOPS-MM plus 40 µg/ml of each amino acid; after 14 h of growth, cells were inoculated (OD₆₀₀ of 0.2) in microtiter plates with the same medium without serine and with 0.5 mg/ml serine hydroxamate. In different sets of experiments, amino acids were omitted or reduced to 10, 5, or 1 µg/ml. Four hours after inoculation, [³²P]H₃PO₄ was added to 100 µCi/ml, and samples were then taken at 15-min intervals for 4 h and handled as described above.

For carbon starvation experiments, amino acids were omitted from the MOPS-MM, since most of them can be used as a carbon source by *R. etli*. Cells were grown in MOPS-MM or MOPS-MM with a reduced glucose concentration (0.02% instead of 0.2%), collected by centrifugation, washed twice, and used to inoculate MOPS-MM with 0.02% glucose (OD₆₀₀ of 0.2). [³²P]H₃PO₄ (100 µCi/ml) was added immediately after inoculation, and samples were taken at intervals and handled as described above.

For carbon and nitrogen starvation procedures, amino acids were also omitted. Two sets of experiments were made: in one set, cells were grown in MOPS-MM; in the other set, cells were grown in MOPS-MM with reduced glucose and ammonium concentrations (0.02% and 1 mM, respectively). After 14 h of growth, cells were washed twice with distilled water and used to inoculate (OD₆₀₀ of 0.2) MOPS-MM with 0.02% glucose and 1 mM ammonium. [³²P]H₃PO₄ (100 µCi/ml) was added immediately after inoculation. Samples were taken at intervals for up to 6 h and handled as described above.

Electron microscopy. Nodules were collected by hand 28 days after plant inoculation, immediately split in half with a scalpel, fixed in Karnovsky's aldehyde solution (17) without Ca²⁺ (pH 7.4), postfixated with 1% OsO₄ in Zetterqvist's buffer (51), and embedded in Epon 812. Thin (60- to 90-nm) sections were stained with uranyl acetate and lead citrate.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *rsh* gene has been deposited in the GenBank database under accession number AY675074.

RESULTS

Isolation of mutant strain LM01 and cloning of the complementing region. A Tn5 insertion library was obtained in the *R. etli* CE3 wild-type strain and enriched for mutants unable to use glutamine as the sole carbon and nitrogen source, as described in Materials and Methods. Isolated colonies were then tested in MM plates with single amino acids as the nitrogen source. One strain, named LM01, was altered in the ability to use amino acids as the nitrogen source. Kinetic growth experiments in shake flasks indicated a pleiotropic phenotype: the *R. etli* LM01 mutant did not grow in MM with glutamate, proline, histidine, alanine, aspartate, leucine, or nitrate as the nitrogen source. This phenotype was independent of the carbon source used, and similar results were obtained with succinate, glucose, sucrose, mannitol, or glycerol as the carbon source. The only exception was observed when aspartate was used as the nitrogen source; in this case, growth dependence of LM01 on the carbon source was observed; with succinate, the mutant did not grow, but with glycerol it grew as well as the wild-type CE3 strain; an intermediate growth phenotype was observed when glucose or mannitol were used as carbon sources.

Addition of the 20 amino acids in low concentration (15 µg/ml of each) to MM succinate-nitrate medium improved growth of LM01 only slightly, indicating that the growth defect of LM01 is not due to an amino acid auxotrophy. In addition, LM01 was unable to use either proline or glutamate as the sole carbon and nitrogen source; with other amino acids, only re-

duced growth was observed. In PY liquid medium, LM01 showed a growth rate similar to that of the wild-type strain ($2.97 \pm 0.094/h$ for LM01 versus $3.09 \pm 0.051/h$ for CE3); interestingly, LM01 mutant colonies on PY plates were smaller than wild-type colonies.

An *R. etli* genomic bank (6) was used to complement the LM01 mutant. Cosmids were crossed from *E. coli* HB101 to the LM01 mutant, and transconjugants that grew in MM with glutamine as the sole carbon and nitrogen source were selected. Four overlapping cosmids complemented the growth defects in MM-glutamine and the pleiotropic phenotype of LM01. The smallest complementing cosmid, pMGD4, had a 20-kb insert and was selected for further studies. Subcloning experiments further localized the complementing region to 4.4 kb contained in two contiguous EcoRI fragments, cloned together in pMGD44 (Table 1). Full complementation was obtained with pMGD44 but not when the two EcoRI fragments were cloned separately in pMGD2234 and pMGD2203, meaning that the complementing region spans the EcoRI site between both fragments. This was further shown by constructing pMGD44- Ω -14, in which an Ω element (36) was inserted in the central EcoRI site of pMGD44; this modified cosmid was unable to complement the defects of LM01, confirming that both EcoRI fragments of pMGD44 are indeed required for LM01 mutant complementation. Furthermore, the EcoRI fragment that carries the Tn5 insertion in LM01 hybridized with the insert from pMGD2234.

The Tn5 insertion in LM01 is located in the *R. etli rsh* gene encoding a member of the RelA/SpoT protein family. To determine precisely the site of the Tn5 insertion in the mutant, the EcoRI fragment that carries the kanamycin resistance gene in LM01 was cloned in pUC18 to give plasmid pAC3, and the DNA sequence on both sides of the transposon was obtained. In addition, the pMGD44 insert was completely sequenced; this sequence revealed an open reading frame (ORF) that spans the central EcoRI site of the pMGD44 insert. The deduced protein sequence from this ORF was used to carry out a BLAST search at the NCBI site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); this search clearly showed that this ORF corresponds to a gene whose product is highly similar to members of the RelA/SpoT family of proteins that regulate the stringent response in bacteria. We therefore refer to this gene as *rsh*. The sequence of the LM01 fragment showed that the Tn5 insertion is indeed located inside the *rsh* gene, right after codon 323, and adds six more codons in phase before reaching a UGA stop codon; it is therefore highly possible that a truncated Rsh protein of 329 amino acids is synthesized in the mutant (see below).

The *R. etli rsh* gene encodes a protein of 744 amino acids that is 54% identical to *E. coli* SpoT (accession number P17580) and 27% identical to *E. coli* RelA (accession number AAA03237). The deduced *R. etli* Rsh protein sequence also displays high similarity to Rsh protein sequences from alpha-proteobacteria, particularly to those of rhizobial species, consistent with the fact that Rsh proteins from alpha-proteobacteria form a separate branch in the RelA/SpoT phylogenetic tree (24, 28). The *R. etli* Rsh sequence showed the following identities to Rsh proteins of alpha-proteobacteria: 85% to *Agrobacterium tumefaciens* Rsh (accession number AAR99902); 83% to *Sinorhizobium meliloti* Rsh (accession number AAG34109); 69% to *Me-*

sorhizobium loti Rsh (accession number NP_108006); 69% to *Brucella suis* Rsh (accession number NP_697666); 68% to *Brucella melitensis* Rsh (accession number NP_540213); 59% to *Bradyrhizobium japonicum* Rsh (accession number AAF04327); and 47% to *Rhodobacter sphaeroides* Rsh (accession number ZP_00005651).

As the sequences of the well-studied *E. coli* RelA and SpoT proteins are related (26), it is difficult to assign (p)ppGpp hydrolase or (p)ppGpp synthetase activities based solely on sequence comparisons. However, a domain called the HD domain is conserved in a superfamily of metal-dependent phosphohydrolases; histidine (H) and aspartate (D) residues in motif II of the HD domain are thought to be involved in (p)ppGpp degradation, because Rsh and SpoT but not RelA proteins conserve them (1). *R. etli* Rsh was compared to the Entrez Conserved Domain Database (22) and shown to have a region that can be aligned to the HD domain (pfam01966) of metal-dependent phosphohydrolases. Partial alignment of *R. etli* Rsh around the conserved motifs I, II, and V of the HD domain shows that the H and D amino acid residues are conserved in this protein; Fig. 1 also shows that the HD domain is highly conserved in Rsh orthologs of rhizobia (1, 22). Partial alignment of the *E. coli* RelA and SpoT sequences to the HD domain indicates the presence of H and D residues in SpoT but not in RelA (Fig. 1). The presence of only one *rsh* gene in the genomes of *S. meliloti*, *B. japonicum*, *M. loti*, and *Agrobacterium tumefaciens*, and the high similarity of *R. etli* Rsh to the proteins encoded by these genes, suggests that they all perform both (p)ppGpp synthesis and hydrolysis.

Another complete ORF is found upstream of *rsh* in the pMGD44 sequence; this ORF encodes a 91-amino-acid protein similar to the omega subunit of bacterial RNA polymerase. The omega subunit is a small protein that copurifies with RNA polymerase holoenzyme and has been identified as a dispensable subunit, even though *E. coli rpoZ* mutants lacking the omega subunit display a phenotype of reduced duplication time (9). Since the Tn5 insertion in LM01 is located downstream of the *R. etli rpoZ* gene, it is unlikely that the omega subunit is involved in the mutant phenotype, as evidenced by lack of complementation with pMGD2234, which carries the *rpoZ* gene from *R. etli* (see below).

Functionality of the *R. etli rsh* gene in *E. coli*. In an initial attempt to determine a physiological role for the *R. etli rsh* gene product, (p)ppGpp accumulation was measured directly in *E. coli* cultures uniformly labeled with ^{32}P . As seen in Fig. 2A, the *R. etli rsh* gene did not complement a *relA* deletion in *E. coli*, since CF1652/pMGD44 does not accumulate (p)ppGpp during amino acid starvation. As expected from this result, the *R. etli rsh* gene did not complement the lack of growth at 37°C of *E. coli* CF1652 ($\Delta relA$) in SMG medium (45). On the other hand, it can be seen (Fig. 2B) that the *R. etli rsh* gene restored (p)ppGpp accumulation during carbon source starvation to a $\Delta relA \Delta spoT$ double mutant (CF1693/pMGD44), indicating that the *R. etli rsh* gene is expressed and produces a functional protein capable of (p)ppGpp synthesis in *E. coli*.

(p)ppGpp determination in *R. etli* uniformly labeled cultures. Classical stringent response is experimentally elicited either by serine hydroxamate addition or by carbon source starvation. Previous reports, however, indicate that not all *Rhizobium* strains that have been tested accumulate (p)ppGpp

	Conserved	H	H L VA		LLHD	VKLADR
R. etl	42	QKHGQ QKRASGDPYISHPLEVA	64	STIAVALL LD TIED	127	SDDVRVLLV KL ADR
A. tum	52	QKHGQ QKRANGDPYISHPLEVA	84	STIAVALL LD TIED	147	SDDVRVLLV KL ADR
S. mel	42	QKHGQ QKRASGDPYISHPLEVA	64	STIAVALL LD TIED	127	SDDVRVLLV KL ADR
M. lot	42	QKHGH QKRASGDPYF SH PLEVA	64	ATIAVALL LD TIED	127	SEDVRVLLV KL ADR
B. mel	42	QKHRS QKRASGDPYF SH PLEVA	64	ATIAIALL LD TIED	127	SEDVRVLLV KL ADR
B. sui	42	QKHGS QKRASGDPYF SH PLEVA	64	ATIAIALL LD TIED	127	SEDVRVLLV KL ADR
B. jap	82	KAHGS QTRASGDPYF SH PLEVA	114	ATIAIALL LD TIED	177	ADDVRVLLV KL ADR
		* * * * *		* * * * *		* * * * *
SpoT	42	DAHEGQTRSSGEPYITHP V AVA	64	ETLMAALL LD VIED	127	VQDIRVILIK L ADR
		* * * * *		* * * * *		* * * * *
RelA	50	YCLQQTQGH P DASLL L WRGVEM	74	DTLRAALL F PLADA	143	VDDFRCVV I KL A ER
				* * *		* * * *

FIG. 1. The Rsh proteins of the *Rhizobiaceae* are highly conserved. Shown is an alignment of partial Rsh sequences against motifs I, II, and V of the HD domain of metal-dependent phosphohydrolases. Sequences correspond to Rsh sequences of *Rhizobium etli* (R.etl), *Agrobacterium tumefaciens* (A.tum), *Sinorhizobium meliloti* (S.mel), *Mesorhizobium loti* (M.lot), *Brucella melitensis* (B.mel), *Brucella suis* (B.sui), and *Bradyrhizobium japonicum* (B.jap) and to *E. coli* SpoT and RelA. The conserved H and D residues of the second motif are shown in boldface. Asterisks under the alignment indicate conserved amino acids.

after serine hydroxamate addition or carbon source exhaustion tests (2, 14). Experiments were designed to find nutritional conditions capable of inducing (p)ppGpp accumulation in ³²P uniformly labeled cultures of the *R. etli* wild-type strain.

In order to probe whether 0.02% glucose or 1 mM ammonium were limiting concentrations for growth, the *R. etli* CE3 wild-type strain was grown in shake flasks with MM plus 0.02% glucose and ammonium at 1, 3, 5, or 10 mM. The optical density and the protein content in all of these culture conditions were reduced with respect to the 0.2% glucose control, and values were similar in all of the conditions tested, with no

observable growth after 12 h. When ammonium concentration was fixed at 1 mM and glucose was added at 0.02, 0.5, 0.1, or 0.2%, growth was reduced with respect to the 10 mM ammonium control, and similar optical density and protein content values were obtained for all of the conditions tested.

Addition of serine hydroxamate to *R. etli* ³²P-labeled cultures grown in MOPS-MM did not induce (p)ppGpp accumulation in any of the amino acid concentrations tested; neither did carbon limitation in 0.02% glucose. When CE3 cells were grown for 14 h in MOPS-MM with 0.2% glucose and 10 mM ammonium and then transferred to MOPS-MM with 0.02% glucose and 1 mM ammonium, (p)ppGpp was not accumulated, but when cells were grown under both carbon and nitrogen limitation for 14 h and then transferred to carbon- and nitrogen-limited MOPS-MM, (p)ppGpp could be detected. Figure 3 shows that CE3 and LM01/pMGD44 did accumulate (p)ppGpp in response to prolonged limitation of both carbon and nitrogen sources, but LM01 did not.

Symbiotic phenotype of the *R. etli* rsh mutant. Seedlings of *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa were inoculated with the LM01 mutant. As shown in Table 2, the dry weight of LM01 nodules was reduced to about 40% of the value obtained with the CE3 wild-type strain. Nodules of LM01-inoculated plants were small and pale white; the number of nodules was not uniform in all plants, and most of them presented an increased number of pseudonodules. The leaves of LM01-inoculated plants showed signs of chlorosis. Acetylene reduction in LM01 nodules could not be detected. Bacteria could be recovered from pseudonodules induced by the mutant, and they were shown to maintain Km resistance and to be impaired in the utilization of single amino acids as nitrogen source; this indicates that the altered phenotype of these nodules is indeed due to inoculation of the mutant. The shoot dry weight at 50 days postinoculation in LM01-inoculated plants was similar to that of noninoculated plants, showing that the mutant is devoid of nitrogen

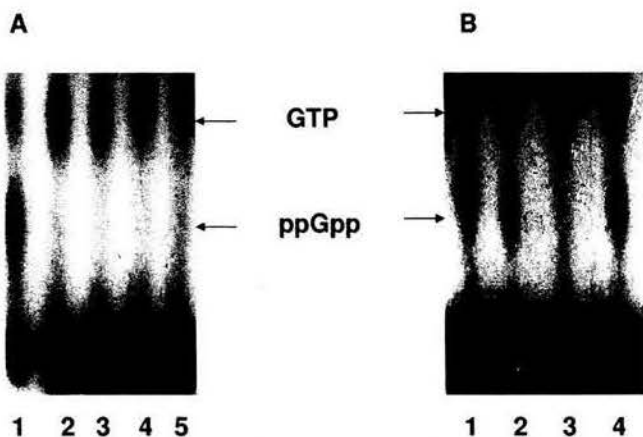


FIG. 2. The *rsh* gene of *R. etli* produces a functional protein in *E. coli* cells. One-dimensional TLC analysis of total intracellular nucleotides extracted from *E. coli* cultures uniformly labeled with [³²P]H₃PO₄. (A) Cells were starved for amino acids in MOPS-MM plus 500 µg/ml serine hydroxamate and 300 µg/ml valine. Lane 1, CF1648 (wild type); lane 2, CF1652 Δ relA; lane 3, CF1693 Δ relA Δ spoT; lane 4, CF1652/pMGD44; lane 5, CF1693/pMGD44. (B) *E. coli* cells were carbon starved in MOPS medium with 0.02% glucose. Lane 1, CF1648; lane 2, CF1652; lane 3, CF1693; lane 4, CF1693/pMGD44.

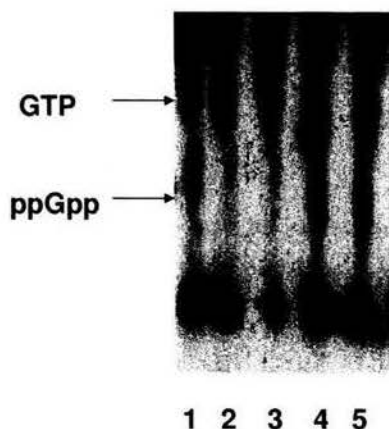


FIG. 3. *R. etli* *rsh* mutants are affected in (p)ppGpp synthesis during carbon and nitrogen starvation. Shown is a one-dimensional TLC analysis of total intracellular nucleotides extracted from *R. etli* cultures uniformly labeled with [32 P]H $_2$ PO $_4$. Cells were grown in MOPS-MM with 1 mM ammonium and 0.02% glucose. Lane 1, CE3 (wild type); lane 2, LM01 (*rsh::Tn5*); lane 3, AC1 (*rsh::Ω*); lane 4, LM01/pMGD44; lane 5, AC1/pMGD44.

fixation activity (Table 2). The LM01/pMGD44 strain showed nodulation and nitrogen fixation levels as high as those of the wild-type strain (Table 2). These results indicate that the *rsh* gene is involved in both the free-living and symbiotic states of *R. etli*.

Nodules were harvested 28 days after inoculation and prepared for electron microscopy as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 4B and D, LM01 nodules showed more bacteroids per plant cell. Mutant bacteroids appeared pleomorphic, as opposed to those of the CE3 wild-type strain (Fig. 4A and C); fewer plant cells were invaded in nodules from LM01-inoculated plants than in CE3-inoculated plants. In addition, LM01 bacteroids did not possess poly- β -hydroxybutyrate granules (Fig. 4B). The LM01/pMGD44 bacteroids showed a wild-type morphology, demonstrating that the deep disruption of symbiosis observed with the LM01 mutant could be complemented with the *R. etli* *rsh* gene.

Nod factor production by the LM01 mutant. In rhizobia symbiosis, Nod factors are responsible for initiating the plant-

microbe interaction, and their synthesis is regulated at different levels (39). The stringent response mutant of *S. meliloti* produces Nod factors like the wild type but overproduces succinoglycan, which is needed for correct nodulation (48). In order to test if the reduced nodulation ability of the *R. etli* LM01 mutant is due to deregulation of Nod factor production, *nodA* gene expression was monitored using plasmid pRP30, which harbors an *R. etli nodA-lacZ* fusion (47). Figure 5 shows that *nodA* expression in the LM01 mutant was constitutive, as opposed to the wild type, where it was expressed only after induction by naringenin. Conjugation of pMGD44 to LM01/pRP30 restored naringenin inducibility of *nodA* gene expression (Fig. 5). To determine whether *nodA* expression was correlated with Nod factor production, Nod factors were identified by thin-layer chromatography in supernatants of induced and noninduced cultures incubated with [14 C]glucosamine (18). As observed in Fig. 6, Nod factor production correlated with β -galactosidase activity, indicating that the *rsh* mutation in LM01 renders *R. etli* constitutive for Nod factor production.

Construction of a second *R. etli* *rsh* mutant and its complementation by a truncated Rsh protein. As described previously, the Tn5 insertion in LM01 would allow the synthesis of a truncated Rsh protein of 329 amino acids. To test whether this truncated protein retains some activity, the chromosomal EcoRI fragment from LM01 that carries the Tn5 insertion was cloned in pUC18, resulting in plasmid pAC3 (Table 1); pAC3 and pMGD44- Ω -14 (which would allow the synthesis of truncated proteins of 329 and 384 amino acids, respectively) were introduced by transformation into the Δ *relA* Δ *spoT* *E. coli* strain CF1693 which is unable to synthesize (p)ppGpp (49) (Table 1). pMGD44- Ω -14 showed partial complementation of the *E. coli* CF1693 strain, while pAC3 did not.

In order to construct a new *rsh* mutant of *R. etli* devoid of any activity, the Ω element was introduced in the unique EcoRV site of the *R. etli* *rsh* gene; this insertion would allow the synthesis of a 98-amino-acid truncated protein. This mutant strain, called AC1, had the same phenotype as LM01 regarding utilization of amino acids, (p)ppGpp accumulation, *nodA* gene activity, and symbiotic phenotypes (Table 2; Fig. 3 and 5). However, when pMGD44- Ω -14, encoding the truncated Rsh protein of 384 amino acids, was introduced into the AC1 mutant, utilization of amino acids as nitrogen and carbon-nitrogen sources was restored. This result was unexpected, as the same plasmid failed to complement LM01.

The *R. etli* *rsh* gene was cloned in the expression vector pMMB206 (29), resulting in plasmid pAC50; this plasmid fully complements both LM01 and AC1 for amino acid utilization, showing that only the Rsh protein is implicated in this phenotype. Unexpectedly, when AC1/pAC50 was used to inoculate *P. vulgaris* plants, an intermediate phenotype in nodule color and size was observed (Table 2). Bacteria recovered from plants inoculated with AC1/pAC50 proved to be a mixed population of cells carrying the plasmid and cells that had lost it. Approximately 90% of 400 colonies recovered from several pseudonodules had lost the plasmid. The nitrogen source utilization and antibiotic resistance phenotypes in these colonies were correlated.

TABLE 2. The *R. etli* *rsh* mutants are defective in symbiosis

Strain	Nodulation ^a	% Acetylene reduction ^b	Plant yield ^c
CE3 (wild type)	0.072 \pm 0.015	100	2.85 \pm 0.41
LM01 (<i>rsh::Tn5</i>)	0.0256 \pm 0.008	N. D. ^d	1.81 \pm 0.22
LM01/pMGD44	0.086 \pm 0.007	114	2.91 \pm 0.34
AC1 (<i>rsh::Ω</i>)	0.0236 \pm 0.002	N. D.	— ^e
AC1/pMGD44	0.069 \pm 0.011	97	—
AC1/pAC50	0.0323 \pm 0.005	39	—
Control with nitrate	N. D.	N. D.	3.17 \pm 0.21
Control without nitrate	N. D.	N. D.	1.69 \pm 0.09

^a Nodulation is expressed in grams of dry weight of nodules at 28 days post-inoculation (dpi) per plant \pm standard deviation; all assays were done with at least 24 plants.

^b Values at 28 dpi, expressed in percentage relative to the wild type.

^c Plant yield is expressed in grams of dry weight per plant at 50 dpi \pm standard deviation.

^d N. D., not detected.

^e —, not determined.

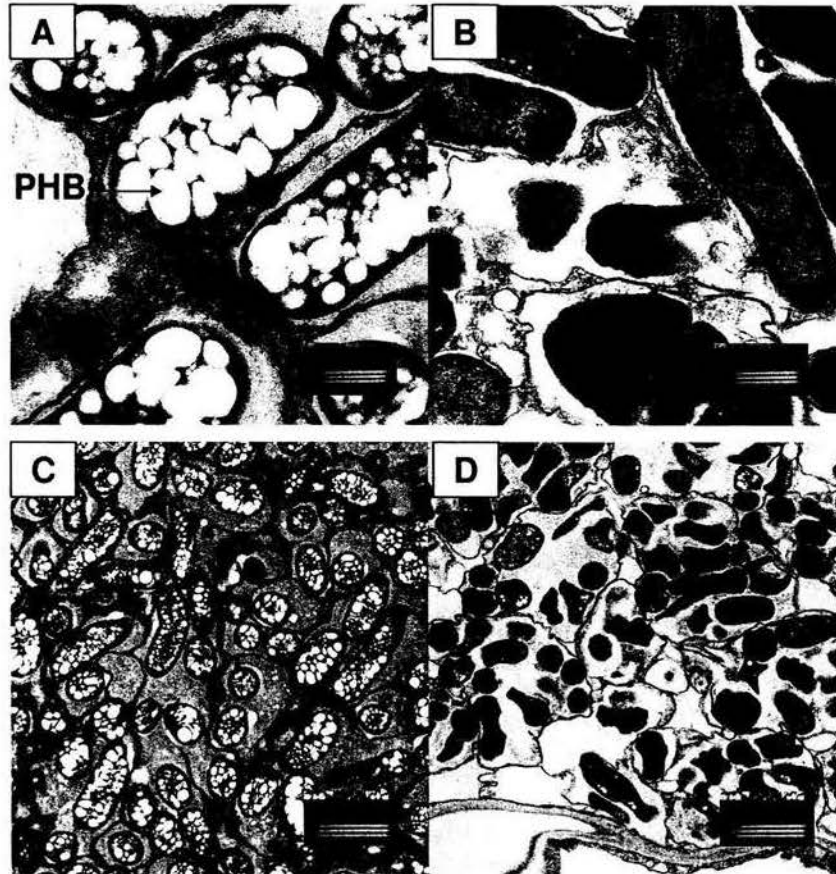


FIG. 4. *R. etli rsh* mutants are affected in nodulation. Ultrastructural differentiation of bacteroids elicited by wild-type CE3 (A and C) and mutant LM01 (B and D) strains. Bars: A and B, 500 nm; C and D, 2 μ m. Note that LM01 mutant bacteroids are pleomorphic and devoid of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) granules (indicated by an arrow).

DISCUSSION

The regulation of amino acid utilization has not been extensively studied in rhizobia, even though amino acid metabolism is apparently implicated in symbiosome development. Here we report the initial characterization of stringent response mutants of *R. etli*. Our results show that mutations in a single gene, *rsh*, that encodes a member of the RelA/SpoT family of proteins deeply affect its ability to use amino acids as nitrogen sources or as sole carbon and nitrogen sources and eliminates (p)ppGpp accumulation. In *E. coli*, a similar phenotype was obtained in CF1693, a $\Delta relA \Delta spoT$ double mutant impaired in the use of aspartate and glutamine; this phenotype is related to the (p)ppGpp null condition, since *E. coli* CF1652 ($\Delta relA$) was still able to use these amino acids as nitrogen sources (49). These results suggest that the *rsh* gene encodes the only protein capable of (p)ppGpp synthesis and hydrolysis in *R. etli*, as has been observed for other members of the alpha-proteobacteria, including *S. meliloti* (48). The two *R. etli rsh* mutants characterized in this work, LM01 and AC1, display a pleiotropic phenotype; like *E. coli* CF1693, they are affected in amino acid and nitrate utilization; however, they are not auxotrophs, unlike *E. coli* strains that are (p)ppGpp null (49). Also, *R. etli* failed to accumulate (p)ppGpp after amino acid starvation elicited by addition of serine hydroxamate, and the same was true when the *rsh* gene was expressed in a $\Delta relA$ mutant of *E.*

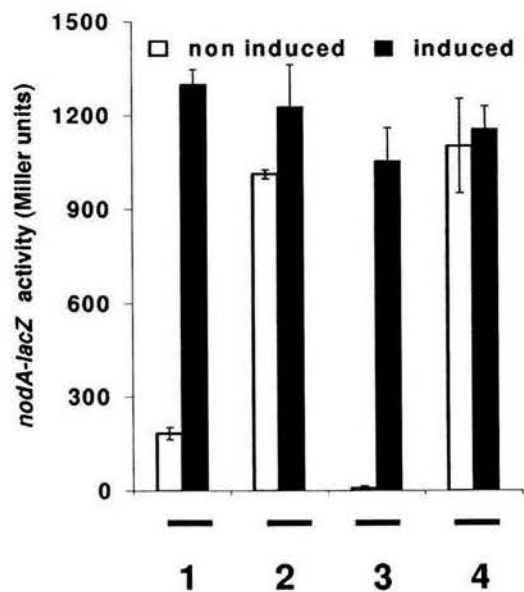


FIG. 5. Transcription of *nodA* gene is constitutive in *R. etli rsh* mutants. A *nodA-lacZ* transcriptional fusion, carried by plasmid pRP30 (47), was used to examine the effect of *rsh* mutations on *nodA* gene expression. Cultures were grown for 12 h in MM with 5 mM ammonium. Naringenin was used as inducer at 1.2 μ M; values are expressed as Miller units \pm standard deviation. (1) CE3 (wild type); (2) LM01 (*rsh::Tn5*); (3) LM01/pMGD44; (4) AC1 (*rsh::Ω*).



FIG. 6. Nod factor production is constitutive in the *R. etli* LM01 mutant. One-dimensional TLC was performed to determine the presence of Nod factors (which migrate at the position shown by two arrows) in supernatants of *R. etli* cultures grown in MM with 5 mM ammonium plus [1-¹⁴C]glucosamine. (1) CE3 (wild type); (2) LM01 (*rsh::Tn5*); (3) LM01/pMGD44. -, without inducer; +, with 1.2 μM naringenin.

coli. While it is possible that the C-terminal domain of *R. etli* Rsh cannot interact with *E. coli* ribosomes, as reported for the Rsh protein of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (24), it is also possible that the *R. etli* Rsh protein is devoid of RelA activity. In *E. coli*, a link between glutamine utilization, the Ntr system, and (p)ppGpp has been reported (35), and it is possible that the phenotype of *R. etli* *rsh* mutants can be partially explained by interactions between nitrogen utilization regulons and (p)ppGpp levels.

Our experiments show that a truncated protein consisting of the first 384 amino acids of the *R. etli* Rsh protein (Rsh384) was sufficient for complementing the growth phenotype of the AC1 mutant; therefore, this truncated protein must be capable of (p)ppGpp synthesis, consistent with structural studies on the *S. dysgalactiae* Rsh protein (13). Unexpectedly, the LM01 mutant (which produces a shorter Rsh of 329 amino acids, Rsh329) could not be complemented by Rsh384. This result suggests that Rsh329 retains some function responsible for the observed negative complementation. It has been suggested that bifunctional RelA/SpoT homologs exist in two conformations that result in reciprocal activity states, one geared for synthesis and one for hydrolysis of (p)ppGpp; specific mutations can selectively eliminate the ability of these proteins to

switch conformations, resulting in mutant proteins with only one of the activities (13). Since the hydrolase domain is located at the extreme N terminus of Rsh proteins (10, 13), it is likely that the truncated Rsh329 is capable of (p)ppGpp hydrolysis and unable to change to a conformation where this activity is absent or reduced. This might impede (p)ppGpp accumulation, resulting in the observed negative complementation. LM01 could be complemented by the full-length *rsh* gene, suggesting that the (p)ppGpp-synthesizing activity of Rsh384 is not as efficient as that of the wild type, underscoring the importance of the C-terminal regulatory domain (13, 24).

Rhizobia are free-living bacteria that are also capable of forming a symbiotic interaction; therefore, they have developed a complex adaptation program for symbiosome formation in which metabolic and genetic regulation interact. The *R. etli* *rsh* mutants reported here were affected in symbiosis, as the number of nodules was reduced and nodules produced by these mutants were not effective in nitrogen fixation. This suggests a central role for (p)ppGpp and the stringent response in the metabolic adaptation of *R. etli* to nodule conditions. Amino acid utilization, deeply affected in the mutants described in this work, appears to play an important role in this adaptation. This is consistent with the finding that nodules produced by mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* unable to transport amino acids are affected in symbiosis (20). It has been reported that the NtrC protein is down-regulated during bacteroid formation in *R. etli* (32) and that *nod* gene expression is a function of the nitrogen status of the cell (25). The fact that Nod factors are expressed constitutively in these mutants, and that they are unable to use amino acids, suggests some important role of the stringent response and (p)ppGpp in controlling the nitrogen status of the cells. This could be major determinant in the inability of *R. etli* *rsh* mutants to establish and maintain a productive symbiosis. If utilization of limiting amino acids is necessary for establishing symbiosis, or if ammonium excretion due to amino acid catabolism is a signal for nodule development (33), it is clear that the inability to respond to these nitrogen conditions would affect proper differentiation of cells into bacteroids. It could also be that some other aspect of the stringent response is responsible for establishing and maintaining communication with plant signals in order to establish a productive symbiosis.

In this work, we showed that (p)ppGpp participates in metabolic adaptation in *R. etli* and in the coordination of interactions between metabolism and genetic regulation leading to symbiosis. This underscores the importance of the stringent response in the development of this bacterial species and highlights the need to study the regulation of central metabolism and its interactions in rhizobia. Further studies are needed to know the details of this adaptive regulation during symbiosis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant IN219001 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A.C.-F. was supported by Programa de Becas Nacionales para Estudios de Posgrado and PAEP, also from UNAM.

We thank Michael Cashel of the National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Md., for providing us *E. coli* strains CF1548, CF1652, and CF1693 and Carmen Quinto of IBT for providing us pRP30 plasmid. We also thank

Luz María Martínez for technical work, Adriana Corvera for her advice in Nod factor determination, and David Romero and Jorge Membrillo for critically reviewing the manuscript.

REFERENCES

- Aravind, L., and E. V. Koonin. 1998. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* **23**:469–472.
- Belitsky, B., and C. Kari. 1982. Absence of accumulation of ppGpp and RNA during amino acid starvation in *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**:4677–4679.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of the DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459–472.
- Cashel, M. 1994. Detection of (p)ppGpp accumulation patterns in *Escherichia coli* mutants. *Methods Mol. Genet.* **3**:341–356.
- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Hernandez, and D. Vinella. 1996. The stringent response, p. 1458–1495. In F. C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, K. W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
- Durán, S., L. Sánchez-Linares, A. Huerta-Saquero, G. Du Pont, A. Huerta-Zepeda, and J. Calderón. 1996. Identification of two glutaminases in *Rhizobium etli*. *Biochem. Genet.* **34**:453–465.
- Ercolano, E., R. Mirabella, M. Merrick, and M. Chiurazzi. 2001. The *Rhizobium leguminosarum glnB* gene is down regulated during symbiosis. *Mol. Gen. Genet.* **264**:555–564.
- Friedman, A. M., S. R. Long, S. E. Brown, W. J. Buikema, and F. M. Ausubel. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* **18**:289–296.
- Gentry, D. R., and R. R. Burgess. 1989. *rhoZ* encoding the omega subunit of *E. coli* RNA polymerase is in the same operon as *spoT*. *J. Bacteriol.* **171**:1271–1277.
- Gentry, D. R., and M. Cashel. 1996. Mutational analysis of the *Escherichia coli spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol. Microbiol.* **19**:1373–1384.
- Givens, R. M., M.-H. Lin, D. J. Taylor, U. Mechold, J. O. Berry, and V. J. Hernandez. 2004. Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J. Biol. Chem.* **279**:7495–7504.
- Hernandez, V. J., and H. Bremer. 1991. *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J. Biol. Chem.* **266**:5991–5999.
- Hogg, T., U. Mechold, H. Malke, M. Cashel, and R. Hilgenfeld. 2004. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* **117**:57–68.
- Howorth, S. M., and R. R. England. 1999. Accumulation of ppGpp in symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria following amino acid starvation. *Arch. Microbiol.* **171**:131–134.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23–28.
- Kahn, M. L., J. Kraus, and J. E. Somerville. 1985. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis, p. 193–199. In H. Evans, P. Bottomley, and W. E. Newton (ed.), *Nitrogen fixation research progress*. M. J. Nijhoff, New York, N.Y.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **27**:137.
- Laeremans, T., I. Caluwaerts, C. Verreth, M. A. Rogel, J. Vanderleyden, and E. Martínez-Romero. 1996. Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:492–500.
- Leong, S. A., G. Ditta, and D. R. Helinski. 1982. Heme synthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for delta-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**:8724–8730.
- Lodwig, E. M., A. H. Hsieh, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie, and P. S. Poole. 2003. Amino acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**:722–726.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
- Maerchler-Bauer, A., J. B. Anderson, C. De Weese-Scott, N. D. Fedorova, L. Y. Geer, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, T. Maděj, T. G. H. Marchler, R. Mazumder, A. N. Nikolskaya, A. R. Panchenko, B. S. Rao, B. A. Shoemaker, V. Simonyan, J. S. Song, P. A. Thiessen, S. Vasudevan, Y. Wang, R. A. Yamashita, J. Y. Jin, and S. H. Bryant. 2003. CDD: a curated entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res.* **31**:383–387.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mechold, U., H. Murphy, L. Brown, and M. Cashel. 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel_{ecp}, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* **184**:2878–2888.
- Mendoza, A., A. Leija, E. Martínez-Romero, G. Hernández, and J. Mora. 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:584–592.
- Metzger, S., E. Sarubbi, G. Glaser, and M. Cashel. 1989. Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J. Biol. Chem.* **264**:9122–9125.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mittenhuber, G. 2001. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolase (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:585–600.
- Morales, V. M., A. Bäckman, and M. Bagdasarian. 1991. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* **97**:39–47.
- Moreno, S., E. J. Patriarca, M. Chiurazzi, R. Meza, R. Defez, A. Lamberti, A. Riccio, M. Iaccarino, and G. Espín. 1992. Phenotype of a *Rhizobium leguminosarum ntrC* mutant. *Res. Microbiol.* **143**:161–171.
- Mylona, P., K. Pawlowsky, and T. Bisseling. 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**:869–885.
- Patriarca, E. J., R. Taté, E. Fedorova, A. Riccio, R. Defez, and M. Iaccarino. 1996. Down regulation of the *Rhizobium ntr* system in the determinate nodule of *Phaseolus vulgaris* identifies a specific developmental zone. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:243–251.
- Patriarca, E. J., R. Taté, and M. Iaccarino. 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:203–222.
- Poole, P., and D. Allaway. 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* **43**:117–163.
- Powell, B. S., and D. L. Court. 1998. Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:1053–1062.
- Prentki, P., and H. M. Krisch. 1984. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**:303–313.
- Quandt, J., and M. F. Hynes. 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15–21.
- Roth, E., K. Jeon, and G. Stacey. 1988. Homology in endosymbiotic systems: the term "symbiosome," p. 220–225. In R. Palacios and D. P. S. Verma (ed.), *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Schultz, M., and A. Kondorosi. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**:33–57.
- Segovia, L., J. P. W. Young, and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:374–377.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784–791.
- Tate, R., E. J. Patriarca, A. Riccio, R. Defez, and M. Iaccarino. 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:582–589.
- Tate, R., A. Riccio, M. Merrick, and E. J. Patriarca. 1998. The *Rhizobium etli* *amtB* gene coding for an NH₄⁺ transporter is down regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:188–198.
- Tate, R., M. Cermola, A. Riccio, M. Iaccarino, M. Merrick, R. Favre, and E. J. Patriarca. 1999. Ectopic expression of the *Rhizobium etli* *amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**:515–525.
- Uzan, M., and A. Danchin. 1976. A rapid test for the *relA* mutation in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69**:751–758.
- Van Rhijn, P., and J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124–142.
- Vázquez, M., A. Dávalos, A. de las Peñas, F. Sánchez, and C. Quinto. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. *J. Bacteriol.* **173**:1250–1258.
- Wells, D. H., and S. R. Long. 2002. The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Mol. Microbiol.* **43**:1115–1127.
- Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel. 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**:5980–5990.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.
- Zetterqvist, H. 1956. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. thesis. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Resultados adicionales

Los exopolisacáridos son importantes para la relación simbiótica en *Rhizobium*; para obtener una medición inicial de la capacidad de producción de polisacáridos en las mutantes LM01 y AC1, así como la cepa silvestre CE3, se estiraron en cajas con medio mínimo utilizando glucosa al 0.2% como fuente de carbono y concentraciones de amonio 10, 5, 3, 0.5 y 0.1 mM. La cepa silvestre presentó colonias cada vez más grandes al reducirse la concentración de amonio; a las menores concentraciones de amonio las colonias eran más mucoides. La mutante LM01 presentó colonias que perceptiblemente eran del mismo tamaño en todas las condiciones, si bien presentan mucosidad ligeramente mayor a las concentraciones menores de amonio. Mientras que la cepa AC1 presentó colonias cada vez más pequeñas cuanto más reducida fue la concentración de amonio; las colonias fueron difícilmente observables a simple vista desde la concentración 1 mM y no son mucoides.

Se prepararon cajas de PY con el colorante calcofluor que es capaz de unirse a polisacáridos y producir fluorescencia, la mutante AC1 produce menos fluorescencia que la cepa silvestre CE3 y la mutante LM01.

Como una forma de explicar la carencia de actividad de fijación de nitrógeno se prepararon cajas con tirosina y sulfato de cobre porque se ha reportado que la producción del pigmento melanina depende de la actividad del gen *nifA*. La cepa silvestre produce un pigmento negro que la mutante AC1 no produce. Por su parte, las colonias de la mutante LM01 presentaron una pigmentación intermedia entre la de la cepa silvestre y las de la cepa AC1.

DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta evidencia de que la respuesta estricta es un elemento central para la regulación y adaptación metabólica de la bacteria *R. etli*. Entre otros aspectos, la respuesta estricta participa en la regulación de la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno y de carbono-nitrógeno, la síntesis de los factores de nodulación, la producción de exopolisacáridos, la adaptación de las bacterias a las condiciones imperantes en los nódulos; y podría participar de la regulación de los genes *nif* y *fix*.

La estrategia de selección de la mutante LM01 y la clonación del gen homólogo a *relA* y *spoT* (*rsh*) de *R. etli*

El aislamiento de mutantes alteradas en la utilización de aminoácidos aparentemente debiera seleccionar genes directamente involucrados en su degradación, su transporte o en la asimilación de los productos que de ellos se obtienen. Es posible también que con protocolos para seleccionar cepas con incapacidad de utilizar fuentes de carbono-nitrógeno se aislen mutantes de actividades centrales del metabolismo como la respiración o los procesos de obtención de energía. El hecho de encontrar un sistema de regulación como la respuesta estricta a partir de un fenotipo de incapacidad de utilizar aminoácidos, pero no a consecuencia de auxotrofia, como sucede en *E. coli* (Xiao *et al.*, 1991), sugiere que el metabolismo de los aminoácidos desempeña un papel en la adaptación de *R. etli* a su ambiente. *R. etli*, como otros rizobios, es capaz de utilizar una mayor diversidad de fuentes de nitrógeno y de carbono-nitrógeno (entre ellos aminoácidos) que otras bacterias. Además, como bacterias de suelo, los rizobios experimentan variaciones en la disponibilidad de nutrientes, una forma de conocer las posibilidades de crecimiento que el medio brinda a la bacteria, podría ser medir la concentración intracelular de compuestos con carbono y nitrógeno. La importancia del

metabolismo de aminoácidos en *R. etli* también podría ser una especialización derivada de su participación en una simbiosis que en su etapa madura puede verse como un intercambio de carbono por nitrógeno.

Un fenotipo de utilización de fuentes alternativas de nitrógeno en bacterias conduce a pensar en la posible afectación del sistema de “regulación de nitrógeno” (*ntr*). El sistema *ntr* controla la utilización de algunos aminoácidos y del nitrato en las bacterias entéricas (Merrick y Edward, 1995). Sin embargo, en *R. etli* ya se había aislado una mutante en un gen del sistema *ntr* (*ntrC*), esa mutante, a diferencia de las mutantes en el gen *rsh*, puede utilizar glutamina, histidina y nitrato y su fenotipo simbiótico es similar al de la cepa silvestre (Moreno *et al.*, 1992). En las bacterias el factor sigma 54 de la RNA polimerasa también participa en el control del metabolismo de nitrógeno (Merrick y Edward, 1995), es interesante que las mutantes AC1 y LM01 compartan algunas características fenotípicas con las mutantes en los genes *rpoN1* y *rpoN2* que codifican para dos factores sigma 54 en *R. etli* (Michiels *et al.*, 1998a; 1998b). Como la mutante en *rpoN1*, las mutantes AC1 y LM01 no pueden crecer con nitrato, alanina o serina como fuentes de nitrógeno y tienen afectada la producción de melanina. Si bien las mutantes AC1 y LM01 presentaron un fenotipo más drástico en cuanto a utilización de aminoácidos y el fenotipo de producción de melanina puede ser consecuencia de otros factores como la expresión del gen *nifA*, (responsable también de la producción de melanina) o de un problema de transporte y/o degradación de la tirosina, el fenotipo en las cepas AC1 y LM01 podría involucrar a *rpoN1*. Por cuanto hace a la mutante en el gen *rpoN2* que participa principalmente en la etapa simbiótica, las mutantes AC1 y LM01 comparten con ella la característica de no tener actividad de fijación de nitrógeno. Sería interesante conocer la expresión de los genes *rpoN1* y *rpoN2* en mutantes del gen *rsh*, es posible que los fenotipos se

deban a una expresión reducida de los factores de transcripción, pero es igualmente factible que la expresión de promotores, en particular la de aquellos dependientes de sigma 54, se vea alterada como en otros sistemas por la falta de (p)ppGpp. Se conoce que el (p)ppGpp modifica la afinidad de la RNA polimerasa por los promotores y por los factores de transcripción (Cashel *et al.*, 1996).

La síntesis de (p)ppGpp en *R. etli*

Las enterobacterias sintetizan (p)ppGpp en respuesta a dos estímulos diferentes, por un lado la falta de aminoácidos para aminoacilar moléculas de tRNA y por otro la limitación de carbono (Cashel *et al.*, 1996). No es claro el evento fisiológico que miden esas bacterias cuando se les limita de carbono, ya que la síntesis inicial de (p)ppGpp la hace la proteína RelA (Cashel *et al.*, 1996). En los experimentos realizados con *R. etli* sólo se observó síntesis de (p)ppGpp debida a la limitación de carbono y de nitrógeno; además, la proteína Rsh de *R. etli* puede responder a la falta de limitación de carbono en células de *E. coli* sintetizando (p)ppGpp. Es posible que el comportamiento descrito sea una consecuencia de la adaptación de la bacteria a su medio, en el que puede esperarse una limitación común de carbono y de nitrógeno. Por ejemplo especies marinas del género *Vibrio* sintetizan (p)ppGpp en respuesta a limitación total de nutrientes en una situación que puede reflejar la situación de fluctuación de nutrientes en su medio (Flärdh *et al.*, 1994). Hasta ahora parece claro que hace falta estudiar al menos los siguientes aspectos en la limitación de aminoácidos en *R. etli*: i) medir la dependencia de la síntesis de rRNA y la producción de (p)ppGpp en medios con hidroxamato de serina, en medios con aminotriazol, en medios sin aminoácidos y en medios limitados de carbono y de nitrógeno, en esas condiciones también debiera cuantificarse la presencia de tRNAs no aminoacilados. Sólo un estudio así ayudaría a conocer la fisiología de la respuesta

estricta en *R. etli*. y ii) aislar ribosomas de *R. etli* y montar un sistema in vitro de respuesta estricta con la proteína Rsh, en búsqueda de su capacidad de síntesis de (p)ppGpp dependiente de ribosomas, ya que existe al menos un ejemplo de que la proteína Rsh de *S. equisimilis* no complementa la deleción del gen *relA* en *E. coli*, pero se asocia con ribosomas de la bacteria *S. equisimilis* para sintetizar (p)ppGpp (Mechold *et al.*, 1996 y 2002).

La utilización de aminoácidos por las mutantes LM01 y AC1 de *R. etli*

La expresión de los operones para la síntesis de aminoácidos está alterada durante la respuesta estricta, podría pensarse que debido a que la respuesta estricta se desplegó porque los aminoácidos faltan, la expresión de esos operones debiera elevarse, pero el único que claramente eleva su expresión es el de síntesis de histidina (Chang *et al.*, 2002). Ese dato sugiere que la adaptación de la bacteria podría responder a un criterio de más largo plazo, en el cual es más importante reducir y adaptar el metabolismo que remediar el problema inmediato de la síntesis de proteínas.

Por otra parte, el crecimiento de una bacteria con un aminoácido como única fuente de carbono y de nitrógeno implica la coordinación de las enzimas que lo han de transportar y degradar con aquellas que asimilan los productos de su degradación. Si consideramos que las curvas de crecimiento para probar la capacidad de utilizar aminoácidos se hacen transfiriendo células de medios ricos a medios con sólo una fuente de nitrógeno y carbono, podemos observar que el problema de utilización de aminoácidos por las mutante AC1 y LM01 puede tener distintos orígenes posibles, entre ellos: i) la respuesta estricta se requiere para el paso de medio mínimo a medio rico; las mutantes de *R. etli* podrían no adaptarse al paso de medio rico a medio mínimo con algunos de los aminoácidos –crecen muy bien en medio mínimo asparagina- debido a que para el crecimiento con algunos aminoácidos se deban regular más

operones, o porque se produzcan codones de hambre en la síntesis de proteínas. ii) la expresión de proteínas tales como transportadores de membrana de los aminoácidos o del amonio que se debe excretar durante su utilización se ve afectada por la falta de (p)ppGpp, lo que produce efectos tóxicos en las células. iii) existe un programa metabólico para la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno y carbono-nitrógeno que en algunos de sus puntos de control requiere de (p)ppGpp.

El anterior es un problema de no fácil solución por medios fisiológicos, pues luego de cuantificar la actividad de las enzimas alanino deshidrogenasa, GOGAT, glutaminasa A y aspartato amino transferasa total (datos no mostrados); se encontró que las dos primeras reducen su actividad en aprox. 50%, la tercera pierde su regulación por presencia de glutamina mientras que la última no se altera.

La proteína Rsh de *R. etli*

Cuando se comparó la secuencia de la proteína Rsh de *R. etli* con las proteínas homólogas de las bacterias *Rhizobiales*, se observó que existe una gran similitud entre ellas, de hecho, tienen residuos idénticos en varios motivos del dominio catalítico HD (figura 1 del artículo). La región de mayor identidad de las secuencias de las proteínas Rsh del grupo de las *Rhizobiales* corresponde a la región amino terminal, residuos 40 a 400 aprox. Es posible que las actividades fisiológicas de esas proteínas sean semejantes; pero, como todavía no han sido descritas las características de las regiones regulatorias, ni su localización en las secuencias de aminoácidos, es posible también que las proteínas en cada microorganismo se regulen de forma diferente, sobre todo porque la región regulatoria de este grupo de proteínas se encuentra en la región carboxilo terminal (Hogg *et al.*, 2004) que es la que en la que tienen menor porcentaje de identidad. Lo cierto es que la presencia de un solo gen homólogo a

relA/spoT en este grupo de bacterias, obliga a reformular la afirmación de que solo las bacterias gram positivas tienen una proteína para las actividades de hidrólisis y síntesis de (p)ppGpp (Mittenhuber, 2001).

De los experimentos de complementación de las mutantes LM01 y AC1 con los alelos de Rsh se puede sugerir que la proteína que sintetiza la mutante LM01 (323aa residuos de Rsh más seis residuos del transposón) mantiene su capacidad de degradación de (p)ppGpp, mientras que la proteína en la mutante AC1 (91aa residuos de Rsh más 7 residuos del elemento omega) seguramente no presenta la actividad de síntesis o degradación de (p)ppGpp. Ese resultado muestra que las actividades de síntesis y degradación de (p)ppGpp se encuentran en la porción amino terminal de la proteína como sucede para las proteínas SpoT y RelA de *E. coli*; además, indica que el fragmento de 55 aminoácidos que no está presente en el alelo de 323aa, pero sí en el de 384aa es muy importante para la actividad enzimática, ya sea como parte del dominio catalítico o para obtener la estructura tridimensional de la enzima, y sugiere que solo existe una proteína Rsh en *R. etli*.

Si la mutante LM01 tiene actividad de hidrólisis de (p)ppGpp y la AC1 ya no tiene actividad, se deben buscar (y son de esperar) condiciones en las que el fenotipo de una y otra mutante sean diferentes. Es igualmente factible que la proteína Rsh truncada de 329 aa tenga una muy baja o desregulada capacidad de síntesis de (p)ppGpp, pues se encontraron fenotipos diferentes en algunas circunstancias.

Conociendo las regiones importantes para la actividad catalítica de la proteína Rsh, y con los datos de la cristalización de la proteína Rsh de *S. equisimilis*; es posible diseñar mutantes alteradas en la capacidad de síntesis y/o degradación de (p)ppGpp en la proteína Rsh de *R. etli*, por ejemplo se podrían tener combinaciones de proteínas con actividades diferentes en el

cromosoma y en plásmidos, logrando distintas concentraciones de (p)ppGpp. Con bacterias que tengan distintas concentraciones de (p)ppGpp se podrían disectar con mayor facilidad diferentes aspectos del metabolismo y la fisiología que dependen de la respuesta estricta.

Aunque de solución probablemente más difícil; el carboxilo terminal de la proteína Rsh puede estudiarse luego de saber si se asocia con ribosomas para sintetizar (p)ppGpp, eso con la finalidad de conocer cuales son las señales que llevan a sintetizar los fosfatos de guanosina.

El problema de la reducción de la capacidad de nodulación y la fijación de nitrógeno en las mutantes AC1 y LM01

Las mutantes LM01 y AC1 de *R. etli* expresan constitutivamente al gen *nodA* (figura 5 del artículo), en el caso de la mutante LM01 se comprobó que además sintetiza constitutivamente los factores de nodulación (figura 6). La expresión constitutiva del gen *nodA* es independiente del medio de cultivo que se utilice, ya sea medio mínimo amonio 5 o 10 mM, PY o medio mínimo nitrato 5 o 10 mM. Ese resultado podría deberse a la dependencia de la regulación de los genes *nod* por la concentración de nitrógeno asimilable en el medio de cultivo dependiente de la proteína NtrC (Mendoza *et al.*, 1995); como las mutantes AC1 y LM01 no pueden utilizar diversas fuentes de nitrógeno podrían estar afectadas en la medición y/o respuesta a la limitación de nitrógeno. Es posible que las mutantes estén permanentemente limitadas de nitrógeno.

El hecho de que las mutantes LM01 y AC1 expresen constitutivamente al gen *nodA* en vida libre no implica que los factores de nodulación se produzcan durante todo el proceso de colonización de la planta y formación del nódulo. Es necesario evaluar la posibilidad de que los genes *nod* se expresen durante todo ese proceso, ya que una desregulación de este tipo podría llevar a las células vegetales a una diferenciación distinta a la que normalmente siguen

durante la formación de los nódulos. Un estudio de histoquímica con un gen reportero de *nodA* podría ser de utilidad con este propósito, lo mismo que un estudio detallado de microscopía de formación de los nódulos en todas sus etapas, pues hasta ahora solo se cuenta microscopía del final del proceso de nodulación (fotografía 4 del artículo).

Los resultados contradictorios sobre la utilización de los aminoácidos en la formación de los bacteroides, obligan a poner en perspectiva la incapacidad de utilizarlos por las mutantes AC1 y LM01 de *R. etli* como una razón de su incapacidad para nodular correctamente. Si bien parece plausible que durante el crecimiento de las bacterias en los hilos de infección estas usen aminoácidos, no se conocen las concentraciones de cada uno de ellos en esa estructura; pues como las mutantes mejoran su crecimiento con una mezcla de aminoácidos en el medio de cultivo, de existir una mezcla balanceada de ellos, seguramente no tendrían problema para crecer.

En este sentido es interesante la propuesta de que los cambios metabólicos y de expresión genética en las bacterias que colonizan a las plantas tienen un punto de inflexión durante el proceso de endocitosis por las células vegetales (Patriarca *et al.*, 2002). Independientemente de si el metabolismo de los aminoácidos es o no indispensable durante la formación de los simbiontes; las mutantes de *R. etli* en la respuesta estricta deben tener menor capacidad adaptativa. Una forma fácil de saber si el proceso de endocitosis provoca un cambio metabólico drástico en las bacterias sería –luego de comprobar control estricto del rRNA en *R. etli*- utilizar genes reporteros como la proteína verde fluorescente con promotores de rRNA, los patrones de expresión debieran ser muy diferentes en las mutantes y la cepa silvestre.

El crecimiento de las bacterias en los hilos de infección también depende de los exopolisacáridos que producen; si bien es necesario cuantificar los que producen las mutantes

AC1 y LM01, es interesante que estén regulados por la respuesta estricta. Es posible que el fenotipo observado en cajas de medio mínimo amonio sea consecuencia de una capacidad de asimilación de amonio reducida y no una modificación de la cantidad o tipo de exopolisacáridos.

El hecho de que las mutante AC1 y LM01 no tengan actividad de fijación de nitrógeno puede ser consecuencia de diversas circunstancias: por ejemplo de una reducida capacidad de intercambiar carbono con la planta; de la falta de expresión de los genes para la fijación de nitrógeno como los genes *nif* y *fix*, una formación incorrecta de la membrana simbiótica, etc. Es necesario cuantificar la expresión de los genes *nifA* o *nifH* con fusiones transcripcionales, pues si bien una forma de medir indirectamente su expresión mediante la producción de melanina, al ser la formación de ese pigmento también dependiente del factor sigma 54 no se puede hacer una inferencia de su expresión. Una medición inicial de los genes *fix* (datos no mostrados) indicó que *fixK*, *fixNd* y *fixNf* tienen expresión reducida en la mutante AC1 pero no en la LM01, es posible que la expresión de esos genes sea responsable en parte del fenotipo, pero no explica la pérdida total de actividad de fijación de nitrógeno. Por cuanto a una formación incorrecta de la membrana simbiótica, una mutante en el transportador de amonio *amtB* tiene el mismo fenotipo que la mutante LM01 en cuanto a formación de nódulos, y sus micrografías muestran bacteroides sin PHB (Cermola *et al.*, 2000). Un argumento para explicar este fenotipo es que la excreción de amonio por los bacteroides sirve como señal de formación de la estructura nodular (Patriarca *et al.*, 2002).

Las bacterias en el nódulo no se dividen, no obstante esa característica no han sido reportados estudios sobre la fase estacionaria de crecimiento de los *Rhizobium*, es claramente esperable que las mutantes de la respuesta estricta de *R. etli* estén afectadas en la entrada en

fase estacionaria y/o en una fase metabólica como la que representa fijar nitrógeno y exportarlo a la planta. En este sentido se podría estudiar como se presentan los cambios de transición de crecimiento en la mutante AC1 y LM01.

El estudio de la expresión genética en mutantes de la respuesta estricta

No es posible argumentar un efecto directo del (p)ppGpp para todos los aspectos afectados en las mutante LM01 y AC1, la respuesta estricta está relacionada con una intrincada serie de sistemas fisiológicos de las bacterias que se podrían sobrelapar unos con otros o ser redundantes. Por ejemplo, el efecto de la poca adaptación de los bacteroides al ambiente de los nódulos podría ser efecto del retardo en la entrada en fase estacionaria más que de la no utilización de aminoácidos o de la producción constitutiva de factores de nodulación, pero también podría ser la suma de todos esos y otros efectos. La expresión de los factores de transcripción puede estar alterada además de la ya conocida transcripción diferencial en presencia o ausencia de (p)ppGpp. Lo más sensato parece ser comenzar a disectar los genes que más alteran su expresión en ausencia de la respuesta estricta y estudiarlos con mutantes y fusiones transcripcionales para descubrir su papel real en los procesos celulares de *R. etli*.

Perspectivas

1. Montar un protocolo de detección de (p)ppGpp con cromatografía de líquidos de alta presión, ya que además de reducir la exposición a las radiaciones de ^{32}P , se podrían conocer con mayor velocidad los niveles de (p)ppGpp en distintas circunstancias fisiológicas, y se podría determinar si la mutante LM01 conserva alguna actividad de síntesis de (p)ppGpp. Medir el control de los RNA ribosomales en *R. etli* en vida libre y simbiosis, buscar si ese control depende del (p)ppGpp. Por otra parte aislar ribosomas de *R. etli* para poder demostrar si la proteína Rsh tiene o no actividad de RelA.
2. Se podrían diseñar distintas proteínas Rsh con capacidad de síntesis gratuita de (p)ppGpp y afectadas en la síntesis o degradación de (p)ppGpp con ayuda de los datos de los alelos 323 y 384, y de la estructura cristalina de Rsh de *S. equisimilis*. Esas proteínas podrían ponerse bajo el control de promotores inducibles en distintas circunstancias para valorar la presencia de la respuesta estricta en distintos estados de la simbiosis o la vida libre. Los distintos alelos de la proteína Rsh nos permitirían hacer combinaciones de proteínas con diferentes capacidades de síntesis o de degradación y lograr distintos niveles de (p)ppGpp.
3. Hacer un estudio microscópico detallado de la formación de los nódulos para conocer la fase en la cual dejan de desarrollarse, buscando en particular los sucesos de entrada en las raíces de la planta y la entrada en las células vegetales. Buscar la relación entre la forma de los bacteroides, el cambio de fuente de carbono que opera en esa etapa y la regulación de algunos genes claves de la asimilación de amonio y la regulación del metabolismo de carbono.
4. Buscar la expresión del gen *nifA* *in vitro* e *in vivo* mediante una fusión del promotor *nif* con una enzima de actividad fácilmente cuantificable, para conocer si la falta de nitrogenasa es debido a problema de expresión de promotores o, si la falta de fijación de nitrógeno es

consecuencia del estado metabólico de los bacteroides. Si bien es difícil valorar la expresión de los genes en cepas bacterianas mutadas en la respuesta estricta, puesto que se ha observado que modifican la expresión de un gran número de genes, podría medirse la expresión de genes involucrados en la regulación del metabolismo de nitrógeno, que además sean importantes para el desarrollo de los nódulos, como el caso de *ntrC*. o *rpoN*.

5. Medir la expresión de los genes *rpoN1*, *rpoN2* y *ntrC* en las mutante AC1 y LM01 para conocer si el metabolismo de nitrógeno está afectado desde la expresión de los genes que participan de su control.

Las mutantes de la respuesta estricta de *R. etli* también podrían ser utilizadas para ensayos de microarreglos de DNA o de proteómica, buscando genes que se regulan en cualquier sentido, tomando en cuenta resultados con mutantes de respuesta estricta de otras bacterias en estudios de proteómica, es posible esperar que gran cantidad de genes varíen su expresión y podrían ser resultados interesantes o absolutamente desconcertantes, sin embargo -creo- útiles. De los experimentos propuestos podría conocerse si la respuesta estricta forma parte del programa de regulación de la expresión genética que opera en el desarrollo de los bacteroides, o bien si los cambios provocados por su falta se expanden a todos los genes de la bacteria.

Es necesario medir la actividad de los genes para la utilización y síntesis de aminoácidos en *R. etli* en distintas condiciones. Es probable que como en *E. coli*, para *R. etli*, la presencia en el medio de cultivo de algunos aminoácidos desequilibre la expresión de los operones de síntesis de aminoácidos que necesite de la respuesta estricta para equilibrarse. En ese mismo sentido se debería buscar una condición fisiológica que proporcione expresión desbalanceada de los operones (algunos de ellos) para la síntesis de aminoácidos. Cuando se tenga esa condición se podría utilizar el hidroxamato de serina o el aminotriazol para determinar si realmente la

proteína Rsh de *R. etli* tiene actividad de síntesis de (p)ppGpp ante la limitación de aminoácidos.

Un estudio de la actividad de la nitrato reductasa y la expresión de su gen ayudarían a conocer si la incapacidad de degradar nitrato se debe a una incapacidad de degradarlo/transportarlo o al desequilibrio de síntesis de aminoácidos por expresión descoordinada de los operones para su síntesis.

Si los bacteroides formados por las mutantes en respuesta estricta de *R. etli* son incapaces de hacer el encendido-apagado del metabolismo, es posible que el nódulo presente un cambio estructural, es decir, que no solo sea un error bacteriano sino una respuesta de la planta a dicha modificación.

Hacer un estudio de la síntesis de PHB en medios de cultivo y correlacionarlo con la falta de síntesis de ese compuesto en los nódulos. ¿Es un defecto de expresión genética o un problema de obtención de energía?

Evaluar la expresión de los genes *nod* y el papel de los factores de nodulación en el fenotipo simbiótico de las mutantes *rsh R. etli* (¿se expresan durante todo el proceso de nodulación?, ¿la producción constitutiva de *nodA* es directamente dependiente de ppGpp?, ¿se deforman las raíces de las plantas lo mismo que ante la cepa silvestre?)

Evaluar las condiciones de crecimiento en las cepas mutantes y silvestres al existir un cambio brusco en las condiciones nutricionales, correlacionarlo con sobrevivencia, actividades enzimáticas etc.

Valorar la participación de las proteínas nucleoides en la respuesta estricta de *R. etli*, ya que se ha visto que en otros sistemas participan de la respuesta estricta (Johansson *et al.*, 2000)

Bibliografia

- Allaway, D., Lodwing, E., Crompton, L. A., Wood, M., Parsons, T. R., Wheeler, T., and Pool, S. (2000). Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol Microbiol* **36**:508-511.
- Aguilar, O. M., and Grasso, D. H. (1991). The product of the *Rhizobium meliloti* *ilvC* gene is required for isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J Bacteriol* **173**: 7756-7764.
- Andersson, S. G., and Kurland, C. G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol* **6**:263-268.
- Andersson, S. G., Zomorodipur, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., and Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of the mitochondria. *Nature* **296**:133-140.
- Appels, M. A., and Haaker, H. (1991). Glutamate oxaloacetate transaminase in pea root nodules, participation in a malate/aspartate shuttle between plant and bacteroid. *Plant Physiol* **95**:740-747.
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* **23**:469-472.
- Arcondéguy, T., Huez, I., Tillard, P., Gagneux, C. De Billy, F., Gojon, A., Truchet, G., and Kahn, D. (1997). The *Rhizobium meliloti* P_{II} protein, which controls bacterial nitrogen metabolism, affects alfalfa nodule development. *Genes Dev* **11**:1194-1206.
- Avarbock, D., Salem, J., Li, L., Wang, Z., and Rubin, H. (1999). Cloning and characterization of a bifunctional *relA/spoT* homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*. **233**:261-269.
- Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Falvi, Z., and Kondorosi, A. (1991). Six nodulation genes of *nod* Box4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol Gen Genet* **228**:113-124.
- Barnett, M. J., Swanson, J. A., and Long, S. R. (1998). Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syra*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics* **148**:19-32.
- Barsomian, G. D., Urzainqui, A., Lohman, K., and Walker, G. C. (1992). *Rhizobium meliloti* unable to synthesize anthranilate displays a novel symbiotic phenotype. *J Bacteriol* **174**: 4416-4426.

- Becker, A., Beges, H., *et al.*, (2004). Changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant-Microbe Interact* **17**:292-303.
- Belistky, B., and Kary, C. (1982). Absence of accumulation of ppGpp and RNA during amino acid starvation in *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* **257**:4677-4679.
- Belitskii, B. R., Kulakauskas, S. T., Sukhodolets, V. V. Shakulov, R. S. (1986). Precise mapping of the *gpp* gene involved in guanosine phosphate synthesis and *ilvC-gpp* deletion in the region of the *Escherichia coli* chromosome. *Genetika* **22**:2775-2783.
- Bergensen, F. J., Peoples, M. B., and Turner, G. L. (1991). A role for poly-hydroxybutyrate in bacteroids of soybean root nodules. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* **245**:59-64.
- Bergensen, F. J., and Turner, G. L. (1993). Effects of concentrations of substrates supplied to N₂-fixing bacteroids of soybean root nodules. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* **251**: 95-102.
- Boesten, B., Batut, J., and Boistard, P. (1998). DctBD-dependent and -independent expression of the *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti* C₄-dicarboxylate transport gene (*dctA*) during symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:878-886.
- Borek, E. (1952). Factor controlling aptitude and phage development in lysogenic *E. coli* K-12. *Biochem Biophys Acta* **8**:211-215.
- Borek, E., Ryan, A., and Rockenbach, J. (1955). Nucleic acid metabolism in relation to lysogenic phenomenon. *J Bacteriol* **69**:460-467.
- Borek, E., Rockenbach, J., and Ryan, A. (1956). Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* **71**:318-323.
- Brewin, N. J. (1991). Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**:191-226.
- Brown, M. W., and Williams, P. (1985). The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu Rev Microbiol* **39**:527-556.
- Caetano-Anolles, G., Crist-Estes, D. K., Bauer, W. D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards the plant flavone luteolin and dependence on functional nodulation genes. In Nitrogen Fixation: Hundred years after. Ed. H. Bothe, F. J. de Bruijn, N. E. Newton. P 460. Stuttgart/New York.
- Calvert, H. E., Pence, M. K., Pierce, M., Malik, N. S. A. and Bauer, W. D. (1984). Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infection in soybean roots. *Can J Bot* **62**:2375-2384.

- Carlson, T. A., Martin, G. B., and Chelm, B. K. (1987). Differential transcription of the two glutamine synthetase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **169**:5861-5866.
- Cashel, M., and Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* **221**:838-841.
- Cashel, M. (1969). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **244**:3133-3141.
- Cashel, M. (1994). Detection of (p)ppGpp accumulation patterns in *Escherichia coli* mutants. *Methods Mol Genet* **3**:341-356.
- Cashel, M., Gentry D. R., Hernandez V. J., and Vinella, D. (1996). The stringent response. p. 1458-1495. In F.C. Neidhart, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, K. W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. volI. ASM Press. Washington, D.C.
- Castillo, A., Taboada, H., Mendoza, A., Valderrama, B., Encarnación, S., and Mora, J. (2000). Role of GOGAT in carbon and nitrogen partition in *Rhizobium etli*. *Microbiology* **146**:1627-1637.
- Cermola, M., Fedorova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R., and Patriarca, E. J. (2000). Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**:733-741.
- Chang, D. H., Smalley, D. J., and Conway, T. (2002). Gene expression and profiling of *Escherichia coli* growth transition: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* **45**:289-306.
- Chatterji, D., Fujita, N., and Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the β -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes to Cells* **3**:279-287.
- Chatterji, D., and Ojha, A. K. (2001). Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**:160-165.
- Cevallos, M. A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y., and Mora, J. (1996). Genetic and physiological characterization of *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-hydroxybutyrate. *J Bacteriol* **178**:1646-1654.
- Chakraborty, R., White, J., Takano, E., and Bibb, M. (1996). Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **19**:357-368.

- Condon, C., Squires, C., and Squires, C. L. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**:623-645.
- Crawford, E. W., and Shimkets, L. (2000). The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Develop* **14**:483-492.
- David, M., Daveran, M-L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. and Kahn, D. (1988). Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* **54**:671-683.
- Day, R. B., Loh, J., Cohn, J. R., and Stacey, G. (2000). Signal exchange in the establishment of the *Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In Prokaryotic fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E. (ed) Norfolk, England: Horizon Scientific Press, pp 385-414.
- Day, D. A., Poole, P. S., Tyerman, S. D., and Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* **58**:61-71.
- Debellé, F., Moulin, L., Mangin, B., Dénarie, J., and Boivin, C. (2001). *nod* genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochem Pol* **48**:359-365.
- de Bruijn, F. J., Rossbach, S., Schneider, M., Ratet, P., Messmer, S., Szeto W. W., Ausubel, F. M., and Schell, J. (1989). *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated *loci* involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* **171**:1673-1682.
- Denarié, J., Debellé, F., and Prome, J. C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**:503-535.
- Durán, S., Du Pont, G., Huerta-Zepeda, A., and Calderón, J. (1995). The role of glutaminase in *Rhizobium etli*: studies with a new mutant. *Microbiology* **114**:2883-2889.
- Dusha, I., Bakos, A., Kondorosi, A., de Bruijn, F. J., and Schell, J. (1989). The *Rhizobium meliloti* early genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated: isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity of alfalfa in the presence of ammonium. *Mol Gen Genet* **219**:89-96.
- Dusha, I., and Kondorosi, A. (1993). Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet* **240**:435-444.

- Dusha, I., Oláh, B., Szeglets, Z., Erdei, L. and Kondorosi, A. (1996). *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPSI in *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**:755-765.
- Dworkin, M. (1962). Nutritional requirement for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **82**:250-257.
- Engelke, T., Jording, D., Kapp, D., and Pühler, A. (1989). Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene coding for the C₄-dicarboxylate carrier. *J Bacteriol* **171**:5551-5560.
- Espín, G., Moreno, S., and Guzman, J. (1994). Molecular genetics of the glutamine synthetases in *Rhizobium* species. *Crit Rev Microbiol* **20**:117-123.
- Ercolano, E., Mirabella, R., Merrick, M., and Chiurazzi, M. (2001). The *Rhizobium leguminosarum* *glnB* gene is down-regulated during symbiosis. *Mol Gen Genet* **264**:555-564.
- Ferraioli, S., Taté, R., Caputo, E., Lamberti, A., Riccio, A., and Patriarca, E. J. (2001). The *Rhizobium etli* *argC* gene is essential for arginine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**:250-254.
- Ferraioli, S., Taté, R., Cermola, M., Favre, R., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. (2002). Auxotrophic mutant strains of *Rhizobium etli* reveal new nodule development phenotypes. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**:501-510.
- Fernández-López, M., D'Haese, W., Van Montagu, M., and Holsters, M. (1998). Changes in the glycosylation pattern at the reducing end of azorhizobial Nod factor affect nodulation efficiency. *FEMS Microbiol Lett* **158**:237-242.
- Finan, T. M., Wood, J. M., and Jordan, D. C. (1981). Succinate transport in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **148**:193-202.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**:351-386.
- Fischer, H. M., Alvarez-Morales, A., and Hennecke, H. (1986). The pleiotropical nature of symbiotic regulatory mutants: *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* gene is involved in control of *nif* expression and formation of determinate symbiosis. *EMBO J* **5**:1165-1173.

- Flårdh, K., Axberg, T., Albertson, N. H., and Kjelleberg, S. (1994). Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio sp.* Strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence and deletion of the *relA* gene. *J Bacteriol* **176**:5949-5957.
- Fraser *et al.*, (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* **281**:375-388.
- Friesen, J. D., Fiil, N. P., Parker, J. M., and Haseltine, W. A. (1974). A new relaxed mutant of *Escherichia coli* with an altered 50S ribosomal subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**:3465-3469.
- Gaynor, E. C., Wells, D. H., MacKichan, J. K., and Falkow, S. (2005). The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol Microbiol* **56**:8-27.
- Gentry, D. R., and Burgess, R. R. (1986). The cloning and sequence of the gene encoding omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* **48**:33-40.
- Gentry, D. R., and Burgess, R. R. (1989). *rpoZ* encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is in the same operon as *spoT*. *J Bacteriol* **171**:1271-1277.
- Gentry, D. R., Hernandez, J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., and Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* **175**:7982-7989.
- Gentry, D. R., and Cashel, M. (1996). Mutational analysis of the *Escherichia coli spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol Microbiol* **19**:1373-1384.
- Giblin, L., Boesten, B., Turk, S., Hooykaas, P., and O'Gara, F. (1995). Signal transduction in the *Rhizobium meliloti* dicarboxylic acid transport system. *FEMS Microbiol Lett* **126**:25-30.
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., and Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**:1283-1292.
- Givens, R. M., Lin, M. H., Taylor, D. J., Mechold, U., Bery, J. O., and Hernández, V. J. (2004). Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* **279**:7495-7504.
- Glass, R. E., Jones, S. T., and Ishihama, A. (1986). Genetic studies on the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase VII. RNA polymerase is a target for ppGpp. *Mol Gen Genet* **203**:265-268.

- Gourse, R. L., and Ross, W. (1996). Control of rRNA and ribosome synthesis. En Regulation of gene expression in *Escherichia coli*, edited by Lin and Lynch, Landes Company.
- Göttfert, M., Grob, P., and Hennecke, H. (1990). Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:2680-2684.
- Greenway, D. L., and England, R. R. (1999). The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and σ^S . *Lett Appl Microbiol* **29**:323-326.
- Grosskopf, E., Camha, D. T., Wingender, R., Rohrig, H., Szecsi, J., Kondorosi, E., Schell, J., and Kondorosi, A. (1993). Enhanced level of chalcone synthase in alfalfa nodules induced by a Fix⁻ mutant of *Rhizobium meliloti*. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**:173-181.
- Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Fellay, R. (1998). SyrM of *Rhizobium sp.* NGR234 activates transcription of symbiotic *loci* and controls the level of sulfated Nod factors. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:343-350.
- Haralalka, S., Nandi, S., and Bhadra, R. K. (2003). Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**:4672-4682.
- Hecker, M., Schumann, W., and Volker, V. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**:417-428.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary-phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**:165-168.
- Hernández, V. J., and Bremer, H. (1991). *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J Biol Chem* **266**:5991-5999.
- Hernández, V. J. and Cashel, M. (1995). Changes in the conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediates ppGpp-dependent functions in vivo. *J Mol Biol* **252**:536-549.
- Herrada, G., Puppo, A., and Rigaud, J. (1989). Uptake of metabolites by bacteroid-containing vesicles and by free bacteroids from french bean nodules. *J Gen Microbiol* **135**:3165-3177.
- Hirsch, A. M., Bang, M., and Ausubel, F. M. (1983). Ultrastructural analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **155**:367-380.

- Horvart, B., Bachem, C. W., Schell, J., and Kondorosi, A. (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal interacting with the *nodO* gene product. *EMBO J* **6**:841-848.
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., and Hilgenfeld, R. (2004). Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* **117**:57-68.
- Howorth, S. M., and England, R. R. (1999). Accumulation of ppGpp in symbiotic and free-living nitrogen-fixing bacteria following amino acid starvation. *Arch Microbiol* **171**:131-134.
- Huerta-Saquero, A., Calderón-Flores, A., Díaz-Villaseñor, A., Du Pont, G., and Durán, S. (2004). Regulation of transcription and activity of *Rhizobium etli* glutaminase A. *Biochim Biophys Acta* **1673**:201-207.
- Huerta-Zepeda, A., Ortuño, L., Du Pont, G., Durán, S., Lloret, A., Merchant-Larios, H., and Calderón, J. (1997). Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutant altered in degradation of asparagine. *J. Bacteriol* **179**:2068-2072.
- Jiang, J., Gu, B. H., Albright, L. M., and Nixon, B. T. (1989). Conservation between coding and regulatory elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dct* genes. *J Bacteriol* **171**:5244-5253.
- Johansson, J., Balsalobre, C., Wang, S. Y., Urbonaviciene, J., Jin, D. J., Sondén, B., and Uhlin, B. E. (2000). Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli*. *Cell* **102**:475-485.
- Jones, P. G., Cashel, M., Glaser, G., and Niedhardt, F. C. (1992). Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:3903-3914.
- Kalman, S., Mitchell, W., Marathe, R., Lammel, C., Fan, J., Hyman, R. W., Olinger, L., Grimwood, J., Davis, R. W., and Stephens, R. S. (1999). Comparative genomics of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* **4**:385-389.
- Kahn, M. L., Kraus, J., and Somerville J. E. (1985). A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. P 193-199 in Evans, H., Bottmley, P. and Newton, W. E. (ed), Nitrogen fixation research progress. M. J. Nijhoff New York.
- Kape, R., Parniske, M., Werner, D. (1991). Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol* **57**:316-319.

- Kern, M., Kamp, P. B., Paschen, A., Masepohl, B., and Klipp, W. (1998). Evidence of a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA. *J Bacteriol* **180**:1965-1969.
- Kerppola, T. K., and Kahn, M. L. (1988). Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Gen Microbiol* **134**:913-919.
- Knight, C. D., Rossen, L., Robertson, J. G., Wells, B., and Downie, J. A. (1986). Nodulation inhibition of *Rhizobium leguminosarum* multicopy *nodABC* genes and analysis of early stages of plant infection. *J Bacteriol* **166**:552-558.
- Koonin, E. V., and Rudd, K. E. (1993). SpoU protein of *Escherichia coli* belongs to a new family of putative rRNA methylases. *Nucleic Acids Res* **21**:5519.
- Kondorosi, E., Buiré, M., Cren, M., Lyer, N., Hoffmann, B., and Kondorosi, A. (1991). Involvement of the *syrM* and *nodD3* genes of *Rhizobium meliloti* in *nod* gene activation and in optimal nodulation of the plant host. *Mol Microbiol* **5**:3035-3048.
- Kouchi, H., Fukai, K., and Kihara, A. (1991). Metabolism of glutamate and aspartate in bacteroids isolated from soybean root nodules. *J Gen Microbiol* **137**:2901-2910.
- Ledebur, H., and Nixon, B. T. (1992). Tandem DctD-binding sites of the *Rhizobium meliloti* *dctA* upstream activating sequence are essential for optimal function despite a 50- to -100 fold difference in affinity for DctD. *Mol Microbiol* **6**:3479-3492.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A., and Poole, P. S. (2003). Amino acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**:722-726.
- Lodwig, E., and Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sci* **22**:37-78.
- Lodwig, E., Kumar, S., Allaway, D., Bourdes, A., Prell, J., Priefer, U., and Poole, P. (2004). Regulation of L-alanine dehydrogenase in *Rhizobium leguminosarum* var. *viciae* and its role in pea nodules. *J Bacteriol* **186**:842-849.
- Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* **56**:203-214.
- López, J. M., Dromerick, A., and Freese, E. (1981). Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* **146**:605-613.

- Magnusson, L. U., Nystrom, T., and Farewell, A. (2003). Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *J Biol Chem* **278**:968-973.
- Masuda, S., and Bauer, C. E. (2004). Null mutation of HvrA compensates for loss of an essential *relA/spoT*-like gene in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **186**:235-239.
- Maxwell, C. A., Hartwig, U. A., Joseph, C. M. and Phillips, D. A. (1989). A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **91**:842-847.
- Mechold, U., Cashel, M., Steiner, K., Gentry, D., and Malke, H. (1996). Functional analysis of *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* **178**:1401-1411.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., and Cashel, M. (2002). Intramolecular regulation of opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel_{seq}, the Rel/Spo enzyme for *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* **184**:2878-2888.
- Mendoza, A., Leija, A., Martínez-Romero, E., Hernández, G., and Mora, J. (1995). The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**:584-592.
- Mendoza, A., Valderrama, B., Leija, A., and Mora, J. (1998). *NifA*-dependent expression of glutamate dehydrogenase in *Rhizobium etli* modifies nitrogen partitioning during symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:83-90.
- Merrick, M. J., and Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**:604-622.
- Metzger, S., Sarubbi, E., Glaser, G., and Cashel, M. (1989). Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J Biol Chem* **264**:9122-9125.
- Michael-Reydellet, N., Desnoves, N., de Zamarocky, M., Elmerich, C., and Kaminski, P. A. (1998). Characterization of the *gln-amtB* operon and the involvement of AmtB in methylammonium uptake in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol Gen Genet* **258**:671-677.
- Michiels, J., Van Soom, T., D'Hooghe, I., Dombrecht, B., Benhassine, T., de Wilde P., and Vanderleyden, J. (1998a). The *Rhizobium etli rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *pstN* and *pstA* mutants. *J Bacteriol* **180**:1729-1740.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Verreth, C., and Vanderleyden, J. (1998b). Differential regulation of *Rhizobium etli rpoN2* gene expression during symbiosis and free-living growth. *J Bacteriol* **180**:3620-2628.

Mittenhuber, G. (2001). Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA, and SpoT proteins) *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:585-600.

Moreno, S., Patriarca, E. J., Chiurazzi, M., Meza, R., Defez, R., Lamberti, A., *et al.* (1992). Phenotype of a *Rhizobium leguminosarum ntrC* mutant. *Res Microbiol* **143**:161-171.

Mulligan, J. T. and Long, S. R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:6606-6613.

Mulligan, J. T., and Long, S. R. (1989). A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics* **122**:7-18.

Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1995). Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**:869-885.

Newcomb, W., Sippel, D., and Peterson, R. L. (1979). The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can J Bot* **57**:2603-2616.

O'Hara, G. W., Riley, I. T., Glenn, A. R., and Dilworth, M. J. (1985). The ammonium permease of *Rhizobium leguminosarum* MNF3841. *J Gen Microbiol* **131**:757-764.

Ortuño-Olea, L., and Durán-Vargas, S. (2000). The L-asparaginase operon of *Rhizobium etli* contains a gene encoding an atypical asparaginase. *FEMS Microbiol Lett* **189**:177-182.

Östling, J., Holmquist, L., and Kjelleberg, S. (1996). Global analysis of the carbon starvation response of marine *Vibrio* species with disruptions in genes homologous to *relA* and *spoT*. *J Bacteriol* **178**:4901-4908.

Patriarca, E. J., Chiurazzi, M., Manco, G., Riccio, A., Lamberti, A., De Paolis, A., Rossi, M., Defez, R., and Iaccarino, M. (1992). Activation of the *Rhizobium leguminosarum glnII* gene by the NtrC is dependent on upstream DNA sequences. *Mol Gen Genet* **234**:337-345.

Patriarca, E. J., Taté, R., Fedorova, E., Riccio, A., Defez, R., and Iaccarino, M. (1996). Down-regulation of the *Rhizobium ntr* system in the determinate nodule of *Phaseolus vulgaris* identifies a specific developmental zone. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**:243-251.

Patriarca, E. J., Taté, R., and Iaccarino, M. (2002). Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:203-222.

Peters, N. K., Frost, J. W., and Long, S. R. (1986). A plant flavonone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**:977-980.

- Phillips, D. A., Joseph, C. M., and Maxwell, C. A. (1992). Trigonelin and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **99**:1526-1531.
- Poole, P., and Allaway, D. (2000). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv Microb Physiol* **43**:117-163.
- Povolo, S., Tombolini, R., and Morea, A. (1994). Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. *Can J Microbiol* **40**:823-829.
- Prasad, C. K., Vineetha, K. E., Hassani, H. R., Gupta, R., and Randhawa, G. S. (2000). Isolation and symbiotic characterization of aromatic amino acid auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian J Exp Bot* **38**:1041-1049.
- Preisig, O., Anthamatten, D., and Hennecke, H. (1993). Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:3309-3313.
- Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, III. (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**:4889-1898.
- Rastogi, V. K., and Watson, R. J. (1991). Aspartate aminotransferase activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **173**:2879-2887.
- Reddy, P. S., Raghavan, A., and Chatterji, D. (1995). Evidence for a (p)ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol Microbiol* **15**:255-265.
- Rélic, B., Pérret, X., Estrada-García, M. T., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., *et al.* (1994). Nod factor of *Rhizobium* are the key to the legume door. *Mol Microbiol* **13**:171-178.
- Rosendahl, L., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. (1992). Exchange of metabolites across the peribacteroidal membrane in pea root nodules. *J Plant Physiol* **139**:635-638.
- Roth, E., Jeon, K., and Stacey, G. (1988). Homology in endosymbiotic systems: The term "symbiosome". In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, ed. R. Palacios and DPS Verma, pp. 220-225. St Paul: Am Phytophatol. Soc.
- Salminen, S. O., and Streeter, J. G. (1992). Labelling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with CO₂ 14(2). *Plant Physiol* **100**:597-604.

- Schlaman, H. R., Spaink, H. P., Okker, R. J., and Lugtenberg, B. J. (1989). Subcellular localization of the *nodD* gene product in *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **171**:4686-4693.
- Schreiber, G., Metzger, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M., and Glaser, G. (1991). Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**:3760-3767.
- Schultze, M., and Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* **32**:33-57.
- Selker, J. M. (1988). Three dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. *Protoplasma* **147**:178-190.
- Shatters, R. G., Liu, Y., and Kahn, M. L. (1993). Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* **268**:469-475.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikama, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* spp APS. *Nature* **407**:81-86.
- Shimket, S. J. (1999). Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Ann Rev Microbiol* **53**:525-549.
- Spaink, H. P., Wijffes, A. H. M., Pees, E., Okker, R. J. H., and Lugtenberg, B. J. J. (1987). *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature (London)* **328**:337-340.
- Spaink, H. P., Sheeley, D. M., van Brusel, A. A., Glushka, J., York, W. S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E. P., Reinhold, V. N., and Lugtenberg, B. J. J. (1991). A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature (London)* **354**:125-130.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H. A., and Bibb, M. J. (1991). The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **5**:289-298.
- Swem, D. L., and Bauer, C. (2002). Coordination of ubiquitinol oxidase and cytochrome oxidase *cbb₃* oxidase expression by multiple regulators in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **184**:2815-2820.
- Swanson, J. A., Mulligan, J. T. and Long, S. R. (1993). Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics* **134**:435-444.
- Taté, R., Patriarca, E. J., Riccio, A., Defez, R., and Iaccarino, M. (1994). Development of the *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**:582-589.

- Taté, R., Riccio, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. (1997). A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulfate and nitrate assimilation. *J Bacteriol* **179**: 7343-7350.
- Taté, R., Riccio, A., Merrick, M., and Patriarca, E. J. (1998). The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH_4^+ transporter is downregulated early during bacteroid differentiation. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**:188-198.
- Taté, R., Cermola, M., Riccio, A., Iaccarino, M., Merrick, M., Favre, R., and Patriarca, E. J. (1999). Ectopic expression of the *Rhizobium etli amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**:515-525.
- Taté, R., Riccio, A., Caputo, E., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. (1999). *Rhizobium etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**:24-34.
- Taté, R., Mandrich, L., Spinosa, M. R., Riccio, A., Lamberti, A., Iaccarino, M., and Patriarca, E. J. (2001). The GstI protein reduces NH_4^+ assimilation capacity for *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Plan-Microbe Interact* **14**:823-831.
- Truchet, G. L., Michel, M., and Dènarìe, J. (1980). Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically defective mutants of *Rhizobium meliloti*. *Differentiation* **16**:163-169.
- Tombolini, R., and Nuti, M. P. (1989). Poly(beta-hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different Rhizobia species. *FEMS Microbiol Lett* **60**:299-304.
- Toulokhonov, I. I., Shulgina, I., and Hernández, V. J. (2001). Binding of the transcription effector ppGpp to *E. coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N-terminus of the β' -subunit. *J Biol Chem* **276**:1220-1225.
- Turko, I. V., Francis, S. H., and Corbin, J. D. (1998). Potential roles of conserved amino acids in the catalytic domain of the cGMP-binding-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem* **273**:6460-6466.
- Van Bogelen, R. A., and Neidhart, F. C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:5589-5593.
- Van Rhijn, P., and Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-Plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**:124-142.

- Van Slooten, J. C., Bhuvanavari, T. V., Bardin, S., and Stanley, J. (1992). Two C₄-dicarboxylate transport systems in *Rhizobium sp.* NGR234: rhizobial dicarboxylate transport is essential for nitrogen fixation in tropical legume symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**:179-186.
- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J Bacteriol* **172**:4295-4306.
- Wagner, R. (2002). Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: effect of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp). *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**:331-340.
- Walshaw, D. L., Wilkinson, A., Mundy, M., Smith, M., and Poole, P. S. (1997). Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology-UK* **143**:2209-2221.
- Wang, Y. P., Birkenhead, K., Boesten, B., Manian, S., and O'Gara, F. (1989). Genetic analysis and regulation of *Rhizobium meliloti* genes controlling C₄-dicarboxylic acid transport. *Gene* **85**:135-144.
- Wang, S. P., and Stacey, G. (1991). Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodDI* promoter: a repeated structure for the *nod* box. *J Bacteriol* **173**:3356-3365.
- Waters, J. K., Hughes II, B. L., Purcell, L. C., Gherhardt, K. O., Mawhinney, T., and Emerich D. W. (1998). Alanine not ammonia is excreted from N₂-fixing Soybean nodule bacteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:12038-12042.
- Watson, R. J. (1990). Analysis of the C₄-dicarboxylate transport genes of *Rhizobium meliloti*: nucleotide sequence and deduced products of *dctA*, *dctB* and *dctC*. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**:174-181.
- Watson, R. J., and Rastogi, V. K. (1993). Cloning and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* aminotransferase genes: an aspartate aminotransferase required for symbiotic nitrogen fixation is atypical. *J Bacteriol* **175**:1919-1928
- Wehmeier, L., Schäfer, A., Burkovski, A., Krämer, R., Mechold, U., Malke, H., Pühler, A., and Kalinowski, J. (1998). The role of *Corynebacterium glutamicum rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology* **144**:1853-1862.
- Wells, D. H., and Long, S. R. (2002). The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Mol Microbiol* **45**:1115-1127.

- Wells, D. H., and Long S. R. (2003). Mutation in the *rpoBC* suppress the defects of *Sinorhizobium meliloti relA* mutant. *J Bacteriol* **185**:5602-5610.
- Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., and Nierhaus, K. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**:779-788.
- Whitby, M. C., Ryder, L., and Lloyd, R. G. (1993). Reverse branch of Holliday junction by the RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. *Cell* **75**:341-350.
- Whittehead, L. F., Young, S., and Day, D. A. (1998). Aspartate and alanine movement across symbiotic membranes of soybean nodules. *Soil Biol Biochem* **30**:1583-1589.
- Wireman, J. W., Dworkin, M. (1977). Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **129**:796-802.
- Wright, N. E., and Gilbert, P. (1987). Influence of specific growth rate and nutrient limitation upon the sensitivity of *Escherichia coli* towards chlorhexidine diacetate. *J Appl Bacteriol* **62**:309-314.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**:5980-5990.
- Xu, J., Tozawa, Y., Lai, C., Hayashi, H., and Ochi, K. (2002). A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers (p)ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Genet Genomics* **268**:179-189.
- Yang, X., Kang, C. M., Brody, M. S., and Price, C. W. (1996). Opposing pair of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* **10**:2265-2275.
- Yarosh, O. K., Charles, T. C., and Finan, T. M. (1989). Analysis of the C₄-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **3**:813-823.
- Yuen, J., and Stacey, G. (1996). Inhibition of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum* by organic acids. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**:424-428.
- Zhang, X., Dennis, P., Ehrenberg, M., and Bremer, H. (2002). Kinetic properties of *rrn* promoters in *Escherichia coli*. *Biochimie*. **84**:981-996.

Zhang, S., and Haldenwang, W. G. (2003). RelA is a component of nutritional stress activation pathway of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B . *J Bacteriol* **185**:5714-5721.

Zhang, X., and Bremer, H. (1995). Control of the *Escherichia coli* *rrnB* promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem* **270**:11181-11189.